

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN, HÀM LƯỢNG AXIT BÉO, PHOSPHOLIPID VÀ DẠNG PHÂN TỬ MỘT SỐ PHÂN LỚP PHOSPHOLIPID LOÀI SAN HỒ MỀM *Bebryce* sp.

Đặng Thị Phương Ly^{1*}, Phạm Minh Quân^{1,2}, Trịnh Thị Thu Hương¹, Valeria P. Grigorchuk⁵, Phạm Quốc Long^{1,3}, Lưu Văn Huyền⁴, Andrey B. Imbs⁵

¹Viện Hóa học Các hợp chất Thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Khoa học và công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội

⁵Viện Sinh vật biển Zhirmunsky, phân viện Viễn Đông, Vladivostok, LB Nga

*E-mail: phuongly1412@gmail.com

Ngày nhận bài: 11-2-2017 / Ngày chấp nhận đăng: 26-5-2017

TÓM TẮT: Trong thành phần axit béo của lipid tổng loài san hô mềm *Bebryce* sp., hàm lượng các axit béo không no chiếm ưu thế hơn các axit béo no. Thành phần các axit béo no rất đa dạng, bao gồm tất cả các axit béo no từ C14 tới C26. Các axit béo không no có hàm lượng cao là 20:4n-6, 20:5n-3, 22:6n-3, 24:5n-6, 26:3n-6, 26:2n-6, 26:2n-7, 28:3n-6. Trong thành phần axit béo ở các mẫu san hô nghiên cứu có mặt các axit béo đặc trưng cho sự có mặt của hải miên C25-C28 (còn được gọi là các axit béo demospongiac) với tổng hàm lượng 29,86%. Hầu hết các loài san hô giống *Bebryce* không có tảo cộng sinh zooxanthellae, nên trong thành phần axit béo vắng mặt hoặc có hàm lượng nhỏ các axit béo đánh dấu cho zooxanthellae như 18:5n-3, 18:4n-3, 18:3n-6, 20:4n-3. Thành phần phospholipid của san hô mềm *Bebryce* sp. có mặt các phân lớp đặc trưng của động vật ngành Cnidarian là phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphonolipid là ceramide aminoethylphosphonate (CAEP). PC chiếm hàm lượng cao nhất (37,20 % tổng phospholipid). Dạng phân tử các phân lớp phospholipid của loài *Bebryce* sp. lần đầu tiên đã được nghiên cứu. Kết quả đã nhận dạng được 69 dạng phân tử phospholipid trong 5 phân lớp. Các dạng phân tử chiếm hàm lượng cao trong các phân lớp là PE 20:4/18:1e, PE 20:4/19:1, PC 20:4/18:0e, PC 20:4/16:0e, PS 24:5/18:0e, PI 24:5/18:0, CAEP18:2base/16:0 và CAEP 18:1base/16:0.

Từ khóa: Lipid tổng (TL), lipid phân cực (PoL), molecular species, phospholipid, ethanolamine glycerophospholipid (PE), choline glycerophospholipid (PC), ceramide aminoethylphosphonate (CAEP), phosphatidylinositol (PI), serine glycerophospholipid (PS).

MỞ ĐẦU

Lipid có vai trò quan trọng và cần thiết đối với hoạt động tế bào của tất cả các sinh vật. Các phân tử lipid là đơn vị cấu trúc của màng sinh học và chi phối các quá trình chuyển hóa và tương tác tế bào. Xét về cấu trúc hóa học, các phân tử lipid rất đa dạng và bao gồm hàng

ngàn hợp chất. Các phân tử lipid riêng lẻ tạo nên một lớp lipid, được gọi là dạng phân tử (molecular species) của lớp chất lipid đó. Cơ sở dữ liệu về các dạng phân tử lipid của một đối tượng nghiên cứu được gọi là “lipidome”, việc xây dựng cơ sở dữ liệu dạng phân tử lipid và xác định vai trò sinh học của chúng được gọi là

ngành khoa học “lipidomic” [1]. Trong những năm gần đây, với sự hỗ trợ của các thiết bị phân tích hiện đại, nghiên cứu trong lĩnh vực lipidomic bùng nổ, nhưng dữ liệu lipidome ở ngành động vật có tia biển (Cnidarians) mới chỉ có ở ba loài san hô mềm nhiệt đới [2, 3] và vẫn cần được tiếp tục nghiên cứu. Để xây dựng bức tranh toàn diện về lipidome của một đối tượng cần thực hiện các phân tích cơ bản về thành phần lipid, phospholipid, axit béo, dạng phân tử trong từng lớp chất lipid... của đối tượng đó.

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu trên mẫu san hô *Bebryce* sp. thu thập tại vùng biển Nha Trang, Việt Nam, thu được các số liệu về thành phần axit béo, phospholipid và lần đầu tiên dạng phân tử trong các phân lớp phospholipid của loài san hô *Bebryce* sp. được thực hiện.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu. Mẫu san hô mềm *Bebryce* sp. (Anthozoa, Octocorallia, Alcyonacea, Plexauridae) được thu thập tại Nam Hòn Một, vịnh Nha Trang ở độ sâu 6 - 7 m. Mẫu được định tên bởi TS. Hoàng Xuân Bền và các cộng sự tại Viện Hải Dương Học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chiết lipid tổng. Mẫu nghiên cứu được chiết lipid tổng theo phương pháp của Folch, J. F., [4].

Phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid. Lipid tổng được chấm lên bản mỏng silicagel (6 × 6 cm) 3 vệt với nồng độ khác nhau, sau đó được triển khai trong hệ dung môi n-Hexan:Et₂O:CH₃COOH(70:30:2, v/v/v), hiện hình bằng 5% H₂SO₄ trong MeOH, ở nhiệt độ 180 - 200°C trong thời gian 10 - 20 phút, scan hình ảnh trên máy Epson Perfection 2400 PHOTO (Nagano, Nhật Bản) với độ phân giải và kích thước tiêu chuẩn. Phần trăm của các lớp chất trong lipid tổng được xác định dựa trên sự đo diện tích và cường độ màu trong chương trình phân tích hình ảnh Sorbfil TLC Videodensitometer DV (Krasnodar, LB Nga) [5, 6].

Phương pháp phân tích thành phần và hàm lượng các lớp chất phospholipid

Phân tích định tính sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng 2 chiều. Lipid tổng được hòa tan trong một lượng nhỏ CHCl₃, chấm lên bản mỏng silicagel (6 × 6 cm) và triển khai với hệ dung môi A: CHCl₃:MeOH:28%NH₄OH (70:30:5, v:v:v), chạy xong sấy khô, tiếp tục chạy trong hệ dung môi B: CHCl₃:MeOH:(CH₃)₂CO:CH₃COOH:H₂O (70:30:5:5:2). Các lớp chất PS, PE, CAEP, và LPE được xác định bằng thuốc thử ninhydrin 0,2% trong BuOH, các lớp chất PC, PI được xác định bằng thuốc thử molybdate [7].

Phân tích định lượng. Thành phần hàm lượng của các phospholipid được xác định theo phương pháp Kostetsky [8].

TL (5 μl) được chấm lên bản mỏng silicagel (6 × 6 cm), triển khai trong hệ dung môi A và B như trên. Hiện màu bằng dung dịch 5% H₂SO₄ trong MeOH ở nhiệt độ 120°C. Cạo các lớp chất phospholipid cho vào các ống nghiệm đã đánh dấu tương ứng, bổ sung thêm 50 μl HClO₄ rồi đun trên bếp ở nhiệt độ 180°C trong thời gian 20 phút. Sau khi để nguội, thêm vào mỗi ống nghiệm 450 μl ammonium molybdate, lắc kỹ, đun cách thủy trong 15 phút. Tiến hành đo trên máy quang phổ kế UV 1800 (Shimadzu, Nhật Bản), đo 3 lần và lấy giá trị trung bình hàm lượng các lớp chất, tính hàm lượng phần trăm.

Phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các axit béo. Hỗn hợp axit béo trong lipid tổng được methyl hóa sang dạng methyl ester bằng tác nhân H₂SO₄/MeOH 2%, nhiệt độ cho quá trình chuyển hóa là 80°C, trong thời gian 2 h. Sau đó, hỗn hợp được phân tích trên máy GC-MS của hãng Shimadzu QP-2010 với cột sắc kí LBX (30 m × 0,25 μm × 0,25 μm), sử dụng thư viện phổ chuẩn NIST để so sánh.

Phương pháp phân lập, xác định dạng phân tử lớp chất PC. Phân lớp phosphatidylcholine được phân lập từ lipid tổng bằng sắc kí cột (CC), sau đó tinh chế lại bằng sắc kí bản mỏng bằng các hệ dung môi phù hợp. Phân đoạn thu được được phân tích trên thiết bị LCMS IT-TOF của hãng Shimadzu để nhận biết các dạng phân tử của lớp chất PC. Các phân tích HPLC-HRMS được thực hiện với hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu Prominence với 2 bơm áp suất cao, lò CTO-20A, bơm mẫu tự động, thiết bị truyền

dẫn CBM-20A, thiết bị khử khí DGU-20A3, cột Shim-Pack diol (50 mm × 4,6 mm ID, 5 μm) (Shimadzu, Kyoto, Nhật Bản), sử dụng hai hỗn hợp dung môi A hexane:2-propanol:CH₃COOH:N(CH₃)₃ 82:17:1:0,08 (theo thể tích) và hỗn hợp dung môi B (propanol-2):H₂O:CH₃COOH:N(CH₃)₃ 85:14:1:0,08 (theo thể tích). Lipid được phát hiện bởi bộ phận phân tích khối kết hợp song song hai kỹ thuật IT và TOF trong một bộ phận của thiết bị Shimadzu LCMS-IT-TOF (Kyoto, Nhật Bản), hoạt động đồng thời ở cả hai chế độ ion âm và ion dương trong mỗi phân tích trong điều kiện ion hóa ESI và APCI. Các dạng phân tử của từng phân lớp phospholipid được phát

hiện bởi HRMS và xác định bằng việc so sánh với bộ phổ chất chuẩn của hãng Shimadzu Solution với phần mềm xử lý v.3.60.361. Quá trình định lượng các loại phân tử của mỗi lớp chất lipid phân cực được tính toán theo diện tích mỗi pic chất thu được trên phổ ion âm và ion dương [3].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thành phần và hàm lượng axit béo trong lipid tổng mẫu san hô mềm *Bebryce* sp. Lipid tổng sau khi được metyl ester hóa và đưa vào phân tích, kết quả thu được về thành phần và hàm lượng các axit béo của loài san hô mềm *Bebryce* sp. được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần và hàm lượng axit béo trong lipid tổng mẫu san hô mềm *Bebryce* sp.

STT	Axit béo	Hàm lượng (%)	STT	Axit béo	Hàm lượng (%)	
1	14:0	0,81	29	22:5n-6	0,92	
2	i-15:0	0,23	30	22:6n-3	1,65	
3	ai- 15:0	0,03	31	22:4n-6	0,45	
4	15:0	0,26	32	22:5n-3	0,13	
5	i-16:0	0,23	33	22:1n(-9, -7)	0,20	
6	16:1n (-9, -7)	1,43	34		22:0	2,99
7	16:0	8,37	35		23:0	0,13
8	17:0 nhánh	0,31	36	24:5n-6		4,08
9	7-Me-16:1n-10	1,33	37	24:6n-3		0,80
10	i-17:0	0,66	38	24:1n-9		0,48
11	ai-17:0	0,39	39	24:1n-7		4,38
12	17:0	1,33	40		24:0	1,96
13	18:0 nhánh	0,17	41	25:2n-6		0,79
14	18:4n-3	0,30	42		25:0	0,29
15	18:2n-9	0,52	43	26:3n-6		1,50
16	18:1n-9	1,51	44	26:2n-6		18,17
17	18:1n-7	2,18	45	26:2n-7		1,94
18	18:0	7,00	46	26:1n-9		1,38
19	19:0 nhánh	0,39	47	26:1n-7		1,59
20	19:1n	0,25	48		26:0	0,27
21	19:0	0,59	49	28:3n-6		3,93
22	20:4n-6	12,31		Khác		6,35
23	20:5n-3	2,15		Tổng HL các axit béo no		28,50
24	20:3n-6	0,22		Tổng HL các axit béo không no		64,90
25	20:3n-3	0,32		Tổng HL các axit béo đa nối đôi		50,18
26	20:1n-9	0,22		Tổng HL các axit béo n-3		5,35
27	20:1n-7	0,02		Tổng HL các axit béo n-6		42,89
28	20:0	1,69		Tổng HL các axit béo n-9		3,59
29	21:0	0,40				

Trong thành phần axit béo trong lipid tổng của loài san hô mềm *Bebryce* sp. hàm lượng

các axit béo không no chiếm ưu thế hơn hẳn so với các axit béo no. Chỉ chiếm 28,5% lipid

tổng, nhưng thành phần các axit béo no trong mẫu rất đa dạng, bao gồm tất cả các axit béo no từ C14 tới C26, trong đó các axit béo no mạch nhánh. Sự khác biệt về hàm lượng các axit béo no hoặc 1 nối đôi như ai-15:0, ai-16:0, 17:0, i-17:0, ai-17:0, 18:0 nhánh, 18:1n-7, 19:0, ai-19:0, 20:1n-7 giữa nhóm san hô có chứa tảo cộng sinh zooxanthellae và không chứa zooxanthellae đã được ghi nhận trong nghiên cứu trước đó [9]. Các axit béo không no có hàm lượng cao là 20:4n-6, 20:5n-3, 22:6n-3, 24:5n-6, 26:3n-6, 26:2n-6, 26:2n-7, 28:3n-6. Các axit béo tetracosapolyenoic 24:5n-6 và 24:6n-3 là axit béo đánh dấu điển hình cho san hô mềm (san hô tám ngăn) (khi so sánh với san hô tạo rạn (san hô sáu ngăn) và hydrocoral) có tổng hàm lượng là 4,88% tổng axit béo.

Điểm đặc biệt trong thành phần axit béo ở san hô loài *Bebryce* sp. là việc tìm thấy các axit béo đặc trưng cho sự có mặt của hải miên C25 - C28 (còn được gọi là các axit béo demospongiac) với hàm lượng khá cao (29,86%). Vấn đề này đã từng được tác giả Imbs và nnk., đề cập tới khi nghiên cứu thành phần axit béo của loài san hô *Bebryce studeri* thu thập tại vùng biển Việt Nam [9]. Sự phát hiện này cũng đã từng gây bất ngờ cho nhóm nhà khoa học nghiên cứu về san hô này, bởi những axit béo, axit béo demospongiac không hề được tìm thấy ở các loài san hô khác. Điều này sau đó được lý giải qua các tài liệu đã được công bố về sự có mặt của các hải miên cộng sinh trong các loài san hô giống *Bebryce* của tác giả Fabricius và Alderslade [10]. Hầu hết các loài san hô giống *Bebryce* không có tảo cộng sinh zooxanthellae, do đó trong thành phần axit béo cũng vắng mặt hoặc có hàm lượng rất nhỏ của các axit béo đánh dấu cho zooxanthellae như 18:5n-3, 18:4n-3, 18:3n-6, 20:4n-3,... [9].

Thành phần và hàm lượng các phân lớp chất phospholipid trong lipid tổng. Sau khi xác định định tính trên bản mỏng 1 chiều và 2 chiều, sử dụng các chất chuẩn và các phương pháp đã được công bố [6, 7], kết hợp với các tài liệu tham khảo đã có về các lớp chất phospholipid của san hô, chúng tôi xác định được trong lipid loài san hô *Bebryce* sp. có mặt các phân lớp phospholipid đặc trưng của động vật ngành Cnidarian là phosphatidyl-

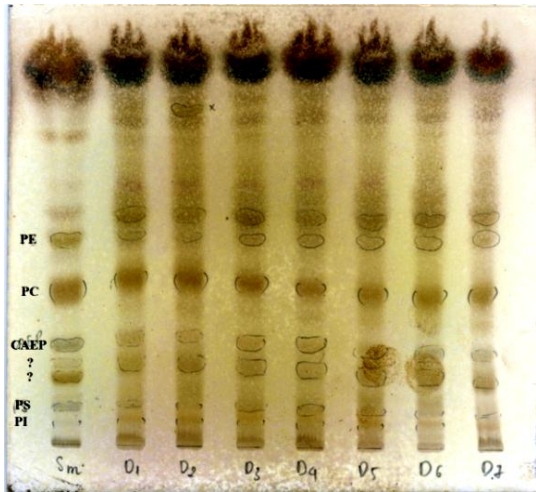
ethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI) và phosphonolipid ceramide aminoethylphosphonate (CAEP). Ngoài ra trong mẫu *Bebryce* sp., ngoài các lớp chất cơ bản trên chúng tôi cũng nhận thấy sự có mặt của một số phospholipid khác, tuy nhiên để xác định một cách chắc chắn thì cần có những phân tích sâu hơn. Sau khi định tính được các phospholipid, chúng tôi tiến hành phân tích định lượng theo phương pháp của Kostetsky [8]. Kết quả thu được được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Thành phần và hàm lượng các phospholipid của loài san hô mềm *Bebryce* sp.

TT	Phân lớp phospholipid	Hàm lượng (%)
1	Ethanolamine glycerophospholipid (PE)	17,13
2	Choline glycerophospholipid (PC)	37,20
3	Ceramide aminoethylphosphonate (CAEP)	12,13
4	Serine glycerophospholipid (PS)	10,47
5	Phosphatidylinositol (PI)	9,0
6	Khác (các lysophospholipid, chưa xác định)	14,03

Về thành phần phospholipid ở mẫu san hô mềm được nghiên cứu, phân lớp phosphatidylcholine (PC) chiếm 37,20% của tổng phospholipid, cao vượt trội so với các phân lớp khác. Phân lớp PE chiếm hàm lượng cao thứ hai là 17,13%, tuy nhiên cũng không có sự khác biệt quá nhiều so với các phân lớp còn lại là CAEP, PS, PI (hàm lượng dao động từ 9,0% đến 14,03%). Sự có mặt của phân lớp CAEP (phosphonolipid) trong thành phần lipid phân cực là một trong những đặc trưng cơ bản của ngành ruột khoang [11]. Khả năng sinh tổng hợp phosphonolipid cũng từng được nghiên cứu và công bố đối với loài sứa và hải quỳ biển [12, 13]. Đây là một trong những đặc trưng quan trọng của sự chuyển hóa lipid trong Cnidarian. Dù có sự tương đồng với các công trình nghiên cứu trước đó về thành phần phospholipid trong lipid các loài san hô mềm với những phospholipid chính là PC, PE, PS, PI và phosphonolipid chủ yếu là CAEP, nhưng trong nghiên cứu này, kết quả thu được về hàm lượng phospholipid có sự khác biệt đáng kể so với nghiên cứu trước đó về mẫu san hô *Bebryce indica* thu thập tại vùng biển Việt Nam [14]. Trong đó, ở mẫu *Bebryce indica*, phân lớp PC

vẫn chiếm tỉ lệ cao nhất, tuy nhiên chỉ 15,1% tổng phospholipid, hàm lượng PE chỉ chiếm 5,4%. Trong thành phần phospholipid mẫu *Bebryce indica*, nhóm tác giả xác định được sự có mặt của PG, và các lysophospholipid như lysophosphatidylcholine LPC, lysophosphatidylserine LPS.



Hình 1. Hình ảnh TLC của phospholipid loài san hô mềm *Bebryce sp.*

Kết quả phân tích dạng phân tử của một số phospholipid mẫu san hô mềm *Bebryce sp.*

Sau đã được định tính/định lượng, các phospholipid được phân lập để đưa vào phân tích. Sử dụng phổ khối phân giải cao LC-MS IT TOF, chúng tôi đã nhận dạng được các dạng phân tử có mặt trong các phân lớp này. Kết quả về thành phần và hàm lượng các dạng phân tử một số phân lớp phospholipid của mẫu san hô mềm *Bebryce sp.* được trình bày ở bảng 3. Do ảnh hưởng sự có mặt của hải miên cộng sinh, nên thành phần axit béo của mẫu san hô được nghiên cứu rất đa dạng, kéo theo đó là sự đa dạng về thành phần dạng phân tử của các phân lớp phospholipid. Tổng cộng 70 dạng phân tử phospholipid đã được xác định, trong đó có: 13 dạng phân tử phosphatidylethanolamine, 10 dạng phân tử phosphatidylcholine, 10 dạng phân tử phosphatidylserine, 30 dạng phân tử phosphatidylinositol, 6 dạng phân tử ceramide aminoethylphosphonate; cao hơn nhiều so với số liệu được công bố trong các nghiên cứu trước đó về phospholipid 3 loài san hô mềm Việt Nam *Xenia sp.* (40 dạng phân tử),

Sinularia macropodia (30 dạng phân tử) và *Capnella sp.* (48 dạng phân tử) [2, 3, 15].

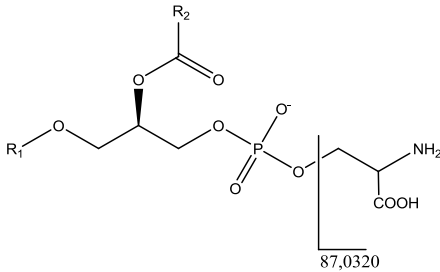
Ở phân lớp phosphatidylethanolamine, phần lớn các dạng phân tử xác định được ở dạng *O*-alkyl và *O*-alkenyl PE, khi trong phân tử chỉ có một axit béo, mạch còn lại ở dạng alkyl hoặc alkenyl. Trên phổ ion âm, ion phân tử $[M-H]^-$ có tín hiệu mạnh nhất tại giá trị m/z 750,5447 và m/z 778,5473 tương ứng với các dạng phân tử PE 20:4/18:1e (19,55%) và PE 20:4/19:1 (29,97%) (e: ether, thể hiện có mặt mạch alkyl C18:1). PE 20:4/18:1e cũng là dạng phân tử chiếm hàm lượng cao nhất trong phân lớp phosphatidylethanolamine của 3 mẫu san hô được nghiên cứu trước đó. Hàm lượng này ở mẫu *Bebryce sp.* thấp hơn và chỉ cao thứ 2 trong phân lớp. Trong lớp chất này, có mặt nhiều nhất là axit béo 20:4n, ngoài ra còn có 20:5n và 24:5n. Dựa vào kết quả phân tích axit béo ở trên, có thể xác định được 20:4n là axit béo arachidonic 20:4n-6.

Trong phân lớp phosphatidylcholine xác định được 10 dạng phân tử và hầu hết đều là các *O*-alkyl PC. Đối với PC, tín hiệu của ion phân tử trên phổ ion dương quan sát tốt hơn ion phân tử trên phổ ion âm. Trên phổ ion dương MS¹, hai tín hiệu của ion $[M+H]^+$ có cường độ mạnh nhất tại giá trị m/z 768,5956 và m/z 796,6223 tương ứng với hai dạng phân tử PC 20:4/18:0e và PC 20:4/16:0e với hàm lượng lần lượt là 18,95% và 22,08%. Trong phân lớp này, axit béo có mặt đa dạng hơn, ngoài 20:4n còn có 18:1n, 18:4n, 20:5n, 22:5n. Ngoài ra, còn có một số dạng phân tử chưa xác định (tổng hàm lượng 14,18%) do hàm lượng thấp nên không thu được các dữ liệu về phổ MS², MS³.

Phân lớp phosphatidylserine có mặt nhiều các axit béo mạch dài C24-C26. Có 10 dạng phân tử PS được xác định, trong đó PS 24:5/18:0e chiếm tới 77,22% trong phân lớp. Trên phổ ion âm PS 24:5/18:0e cho ion phân tử $[M-H]^-$ có tín hiệu tại giá trị m/z 850,5995. Đối với các hợp chất là phosphatidylserine, trong sự phân mảnh của ion phân tử $[M-H]^-$ trên phổ MS², sự tạo thành ion mảnh $[M-H-C_3H_5NO_2]^-$ (khi ion mẹ bị mất đi một mảnh trung hòa tương ứng với nhóm serine C₃H₅NO₂ - khối lượng tính toán là 87,0320) luôn là một trong những tín hiệu đặc trưng và hữu hiệu để nhận biết phân tử PS trên phổ ESI-MS (hình 2) [15].

Bảng 3. Thành phần dạng phân tử các phân lớp phospholipid trong mẫu san hô *Bebryce* sp.

Phân lớp phospholipid	Thời gian lưu	M-H	Công thức phân tử	Dạng phân tử	Hàm lượng trong phân lớp (%)
PE	5,07	722,5138	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	20:4/16:1e	4,87
	4,86	724,529	C ₄₁ H ₇₆ NO ₇ P	20:4/16:0e	0,21
	4,92	736,5331	C ₄₂ H ₇₆ NO ₇ P	20:4/17:1e	3,87
	4,68	738,5394	C ₄₂ H ₇₈ NO ₇ P	20:4/17:0e	3,91
	4,71	750,5447	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	20:4/18:1e	19,55
	4,5	752,5561	C ₄₃ H ₈₀ NO ₇ P	20:4/18:0e	3,81
	4,74	762,5459	C ₄₄ H ₇₈ NO ₇ P	22:5/17:1e	4,64
	4,38	764,5513	C ₄₄ H ₈₀ NO ₇ P	20:4/19:1e	1,71
	3,96	776,5632	C ₄₅ H ₈₀ NO ₇ P	20:4/20:2e	8,02
	4,5	778,5473	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	20:4/19:1	29,97
	4,17	792,5585	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	20:4/20:1	9,10
	4,35	804,586	C ₄₇ H ₈₄ NO ₇ P	24:5/18:1e	4,62
				Khác	5,73
PC		M+H			
	7,56	740,566	C ₄₂ H ₇₈ NO ₇ P	18:4/16:0e	5,90
	6,6	746,6126	C ₄₂ H ₈₄ NO ₇ P	18:1/16:0e	2,70
	7,23	766,5765	C ₄₄ H ₈₀ NO ₇ P	20:5/16:0e; 20:4/16:1e (5:1)	14,64
	6,84	768,5956	C ₄₄ H ₈₂ NO ₇ P	20:4/16:0e	18,95
	6,57	782,609	C ₄₅ H ₈₄ NO ₇ P	20:4/17:0e	8,99
	6,93	792,585	C ₄₆ H ₈₂ NO ₇ P	22:6/16:0e	4,95
	6,57	794,601	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	22:5/16:0e; 20:5/18:0e (1:1)	7,61
6,27	796,6223	C ₄₆ H ₈₆ NO ₇ P	20:4/18:0e	22,08	
			Khác	14,18	
PS		M-H			
	11,22	822,5631	C ₄₆ H ₈₂ NO ₉ P	24:5/16:0e; 22:5/18:0e (10:1)	0,94
	10,8	836,5823	C ₄₇ H ₈₄ NO ₉ P	24:5/17:0e	5,79
	10,89	848,575	C ₄₈ H ₈₄ NO ₉ P	24:6/18:0e; 24:5/18:1e (10:1)	5,55
	10,32	850,5995	C ₄₈ H ₈₆ NO ₉ P	24:5/18:0e	77,22
	10,26	856,6091	C ₄₇ H ₈₈ NO ₁₀ P	24:2/17:0	2,96
	10,05	864,6139	C ₄₉ H ₈₈ NO ₉ P	24:5/19:0e	2,32
	10,03	870,6228	C ₄₉ H ₉₀ NO ₁₀ P	25:2/17:0	1,22
10,46	872,5795	C ₅₀ H ₈₄ NO ₉ P	26:8/18:0e	3,99	
PI		M-H			
	14,88	871,577	C ₄₇ H ₈₅ O ₁₂ P	20:4/18:0e	7,39
	16,86	883,537	C ₄₇ H ₈₁ O ₁₃ P	20:5/18:0	1,03
	16,41	885,5486	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	20:4/18:0	2,80
	16,26	911,5678	C ₄₉ H ₈₅ O ₁₃ P	24:5/16:0; 22:5/18:0 (4:1)	3,13
	15,9	913,5843	C ₄₉ H ₈₇ O ₁₃ P	22:4/18:0	7,06
	13,89	925,621	C ₅₁ H ₉₁ O ₁₂ P	24:5/18:0e	1,37
	15,93	925,585	C ₅₀ H ₈₇ O ₁₃ P	24:5/17:0	2,09
	15,99	937,584	C ₅₁ H ₈₇ O ₁₃ P	24:6/18:0	4,82
	15,57	939,597	C ₅₁ H ₈₉ O ₁₃ P	24:5/18:0	32,47
	14,1	945,6454	C ₅₁ H ₈₅ O ₁₃ P	26:2/16:0	3,35
	15,24	953,6147	C ₅₂ H ₉₁ O ₁₃ P	24:5/19:0	2,51
	14,01	971,6624	C ₅₃ H ₉₇ O ₁₃ P	28:3/16:0; 26:3/18:0 (5:1)	2,38
	13,17	987,6938	C ₅₄ H ₁₀₁ O ₁₃ P	26:2/19:0	2,74
	13,32	999,6941	C ₅₅ H ₁₀₁ O ₁₃ P	28:3/18:0; 26:3/20:0; 26:2/20:1 (10:1:1)	4,89
	12,75	1001,7094	C ₅₅ H ₁₀₃ O ₁₃ P	26:2/20:0	8,67
	13,08	1013,7087	C ₅₆ H ₁₀₃ O ₁₃ P	28:3/19:0; 26:3/21:0 (10:1)	1,86
	12,51	1015,7268	C ₅₆ H ₁₀₅ O ₁₃ P	26:2/21:0	1,71
12,66	1027,7235	C ₅₇ H ₁₀₅ O ₁₃ P	28:3/20:0; 26:2/22:1 (10:1)	6,18	
12,03	1029,7415	C ₅₇ H ₁₀₇ O ₁₃ P	26:2/22:0	0,91	
12,33	1041,7351	C ₅₈ H ₁₀₇ O ₁₃ P	28:3/21:0	0,89	
12,48	1053,7345	C ₅₉ H ₁₀₇ O ₁₃ P	28:3/22:1; 26:3/24:1; 26:2/24:2 (10:1:1)	0,84	
11,94	1055,7595	C ₅₉ H ₁₀₉ O ₁₃ P	28:3/22:0; 26:2/24:1 (1:1)	0,89	
CAEP		M-H			
	6,5	631,5199	C ₃₅ H ₇₃ N ₂ O ₅ P	18:0base/15:0	4,55
	8,12	639,4896	C ₃₆ H ₆₉ N ₂ O ₅ P	18:3base/16:0	5,82
	7,61	641,5015	C ₃₆ H ₇₁ N ₂ O ₅ P	18:2base/16:0	36,06
	7,31	643,5166	C ₃₆ H ₇₃ N ₂ O ₅ P	18:1base/16:0	27,87
	6,95	657,5356	C ₃₇ H ₇₅ N ₂ O ₅ P	19:1base/16:0	14,82
	6,77	671,5502	C ₃₈ H ₇₇ N ₂ O ₅ P	20:1base/16:0	8,52
			Khác	2,36	



Hình 2. Sự phân mảnh đặc trưng của phosphatidylserine trong ESI-MS

Đối với loài *Bebryce* sp., phân lớp phosphatidylinositol là lớp chất có thành phần dạng phân tử đa dạng nhất, điều này cũng được ghi nhận ở loài *Capnella* sp. trong những nghiên cứu đầu tiên về dạng phân tử phospholipid của 3 mẫu san hô mềm Việt Nam. Loài *Bebryce* sp. được nghiên cứu có đến 30 dạng phân tử PI đã được nhận dạng. Khác với các phân lớp PE, PC, PS gồm nhiều các alkyl/acyl phospholipid, trong phân lớp PI, hầu hết các dạng phân tử ở dạng diacyl phospholipid. Trong đó, một mạch axit béo là các axit béo no từ C16-22, mạch còn lại có mặt nhiều các axit béo không no đa nối đôi C20-C24 và các axit béo demospongic cũng nằm trong phân lớp này. Hàm lượng cao nhất là PI 24:5/18:0 chiếm 32,47% tổng phân lớp, hàm lượng này ở loài *Sinularia macropodia* là 62,96% và ở loài *Capnella* sp. là 42,65% [15].

Đối với phân lớp ceramide aminoethylphosphonate, trên phổ ESI-MS¹ chọn lọc được tín hiệu của các ion phân tử và phân tích các thông tin MS²/MS³ tương ứng. Ngoài hai dạng phân tử CAEP 18:2base/16:0 và CAEP 18:1base/16:0 đã được nhận dạng trong các mẫu *Xenia* sp., *Sinularia macropodia* và *Capnella* sp., ở loài *Bebryce* sp. còn xác định được thêm được 4 dạng phân tử CAEP là 18:0base/15:0, 18:3base/16:0, 19:1base/16:0, 20:1base/16:0, tuy nhiên CAEP 18:2base/16:0 và CAEP 18:1base/16:0 vẫn là 2 dạng có hàm lượng cao nhất (lần lượt là 36,06% và 27,87%) trong phân lớp.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được thành phần và hàm lượng các axit béo, các lớp chất phospholipid trong lipid tổng

của mẫu san hô mềm *Bebryce* sp. thu thập tại vùng biển Nha Trang, Việt Nam.

Trong thành phần axit béo trong lipid tổng của loài san hô mềm *Bebryce* sp. hàm lượng các axit béo không no (64,9%) chiếm ưu thế so với các axit béo no (28,5%). Thành phần các axit béo no rất đa dạng, bao gồm tất cả các axit béo no từ C14 tới C26. Các axit béo không no có hàm lượng cao là 20:4n-6, 20:5n-3, 22:6n-3, 24:5n-6, 26:3n-6, 26:2n-6, 26:2n-7, 28:3n-6. Trong thành phần axit béo mẫu san hô nghiên cứu có mặt các axit béo đặc trưng cho sự có mặt của hải miên C25-C28 (còn được gọi là các axit béo demospongic) với tổng hàm lượng 29,86%. Hầu hết các loài san hô giống *Bebryce* không có tảo cộng sinh zooxanthellae, nên trong thành phần axit béo vắng mặt hoặc có hàm lượng nhỏ các axit béo đánh dấu cho zooxanthellae như 18:5n-3, 18:4n-3, 18:3n-6, 20:4n-3.

Thành phần phospholipid của san hô mềm *Bebryce* sp. có mặt các chính là phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphonolipid là ceramide aminoethylphosphonate (CAEP). PC chiếm hàm lượng cao nhất (37,20% tổng phospholipid). Ngoài ra trong mẫu *Bebryce* sp., ngoài các lớp chất cơ bản trên chúng tôi cũng nhận thấy sự có mặt của một số phospholipid khác chưa xác định, tổng hàm lượng 14,03%.

Dạng phân tử các phân lớp phospholipid của loài *Bebryce* sp. lần đầu tiên đã được nghiên cứu. Kết quả đã nhận dạng được 69 dạng phân tử phospholipid trong 5 phân lớp. Các dạng phân tử chiếm hàm lượng cao trong các phân lớp là PE 20:4/18:1e, PE 20:4/19:1, PC 20:4/18:0e, PC 20:4/16:0e, PS 24:5/18:0e, PI 24:5/18:0, CAEP18:2base/16:0 và CAEP 18:1base/16:0. Lớp chất PE, PC, PS chủ yếu gồm các phospholipid dạng alkyl/acyl, lớp chất PI phần lớn là các diacyl phospholipid. Lớp chất PI đa dạng nhất về số lượng các dạng phân tử nhận dạng được (30 dạng phân tử), và chứa nhiều các axit béo đa nối đôi C20-C24 và các axit béo demospongic.

Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên về dạng phân tử các phân lớp phospholipid loài san hô *Bebryce* sp. Tiếp nối các công trình nghiên cứu trước đó của các nhà khoa học tại

Việt Nam cũng như trên thế giới, các kết quả thu được sẽ góp phần nhằm bổ sung những thông tin mới về khoa học lipid san hô, nhằm dẫn hoàn thiện bộ cơ sở dữ liệu về loài sinh vật biển quý giá này.

Lời cảm ơn: Công trình trên được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí từ Nhiệm vụ HTQT mã số VAST.HTQT.NGA.12/16-17, Viện Hàn lâm KH&CNVN và Đề tài VANT16-003, phân viện Viễn Đông - Viện Hàn lâm Khoa học Nga (Grant VANT16-003, Russian Academy of Sciences, Far Eastern Branch).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Spener, F., Lagarde, M., Géoên, A., and Record, M., 2003. What is lipidomics?. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**(9), 481-482.
2. Imbs, A. B., Dang, L. P., Rybin, V. G., Nguyen, N. T., and Pham, L. Q., 2015. Distribution of very-long-chain fatty acids between molecular species of different phospholipid classes of two soft corals. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, **4**(4), 205-206.
3. Imbs, A. B., Dang, L. P., Rybin, V. G., and Svetashev, V. I., 2015. Fatty acid, lipid class, and phospholipid molecular species composition of the soft coral *Xenia* sp. (Nha Trang bay, the South China Sea (Bien Dong Sea), Vietnam). *Lipids*, **50**(6), 575-589.
4. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**(1), 497-509.
5. Phattanawasin, P., Sotanaphun, U., Sriphong, L., Kanchanaphibool, I., and Piyapolrunroj, N., 2011. A comparison of image analysis software for quantitative TLC of ceftriaxone sodium. *Science, Engineering and Health Studies (Former name "Silpakorn University Science and Technology Journal")*, **5**(1), 7-13.
6. Svetashev, V. T., and Vaskovsky, V. E., 1972. A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids. *Journal of Chromatography A*, **67**(2), 376-378.
7. Vaskovsky, V. E., and Terekhova, T. A., 1979. HPTLC of phospholipid mixtures containing phosphatidylglycerol. *Journal of High Resolution Chromatography*, **2**(11), 671-672.
8. Kostetsky, E. Y., 1984. The phospholipid-composition of Spongia, Coelenterata, Plathelminthes, Nemertini, Annelida, Sipunculida and Echiurida. *Biologiya Morya-Marine Biology*, (5), 46-53.
9. Imbs, A. B., Demidkova, D. A., Dautova, T. N., and Latyshev, N. A., 2009. Fatty acid biomarkers of symbionts and unusual inhibition of tetracosapolyenoic acid biosynthesis in corals (Octocorallia). *Lipids*, **44**(4), 325-335.
10. Fabricius, K. K., and Alderslade, P. P., 2001. Soft corals and sea fans: a comprehensive guide to the tropical shallow water genera of the central-west Pacific, the Indian Ocean and the Red Sea. *Australian Institute of Marine Science (AIMS)*.
11. Latyshev, N. A., Nguen, K. H., To, T. N., and Svetashev, V. I., 1986. Composition and seasonal fluctuations of alcyonarian phospholipids. *Russ. J. Mar. Biol.*, **12**, 178-182.
12. de Souza, L. M., Iacomini, M., Gorin, P. A., Sari, R. S., Haddad, M. A., and Sasaki, G. L., 2007. Glyco- and sphingophosphonolipids from the medusa *Phyllorhiza punctata*: NMR and ESI-MS/MS fingerprints. *Chemistry and Physics of Lipids*, **145**(2), 85-96.
13. Mukhamedova, K. S., and Glushenkova, A. I., 2000. Natural phosphonolipids. *Chemistry of Natural Compounds*, **36**(4), 329-341.
14. Phạm Quốc Long, Imbs Andrey Borisovich, 2012. Lipit, axit béo và oxylipin của san hô. *Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ*. Tr. 125-184
15. Đặng Thị Phương Ly, 2016. Luận án Tiến sỹ: Nghiên cứu thành phần lipid và các dạng phân tử của phospholipid từ một số loài san hô mềm ở Việt Nam. Học viện Khoa học và công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

INVESTIGATION ON CONTENT OF FATTY ACIDS, PHOSPHOLIPIDS, AND PHOSPHOLIPID MOLECULAR SPECIES COMPOSITION OF THE VIETNAMESE CORAL *Bebryce* sp.

Dang Thi Phuong Ly^{1*}, Phạm Minh Quân^{1,2}, Trinh Thi Thu Huong¹, Valeria P. Grigorchuk⁵, Phạm Quốc Long^{1,3}, Luu Van Huyen⁴, Andrey B. Imbs⁵

¹*Institute of Natural Products Chemistry, VAST*

²*University of Science and Technology of Hanoi, VAST*

³*Graduate University of Science and Technology, VAST*

⁴*Hanoi University of Natural Resources and Environment*

⁵*National Scientific Center of Marine Biology, Far-Eastern Branch
of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation*

ABSTRACT: In the fatty acid composition of total lipid of the soft coral *Bebryce* sp., the concentration of unsaturated fatty acid predominates. The composition of saturated fatty acids is very diverse, including all saturated fatty acids from C14 to C26. The unsaturated fatty acids with high concentration are C20: 4n-6, 20:5n-3, 22:6n-3, 24:5n-6, 26:3n-6, 26:2n-6, 26:2n-7, 28:3n-6. In the fatty acids composition of the studied coral, there is presence of characterized fatty acids for the existence of sponges C25-C28 (demospongiac fatty acids) with total content 29,86%. Most of the *Bebryce* coral species do not have zooxanthellae, therefore, in the fatty acids composition, either it is lack or contains only a small amount of markers fatty acids for zooxanthellae such as 18:5n-3, 18:4n-3, 18:3n-6, 20:4n-3. In the phospholipid content of the soft coral *Bebryce* sp., there is presence of characterized classes for *Cnidarian* animals such as phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphonolipid is ceramide aminoethylphosphonate (CAEP). PC account for the highest concentration (37,20% of total phospholipid). The molecular species of phospholipid classes of *Bebryce* sp. for the first time were investigated. In the results, there we 60 phospholipid molecular species identified in 5 classes. The molecular species with high content in the classes were PE 20:4/18:1e, PE 20:4/19:1, PC 20:4/18:0e, PC 20:4/16:0e, PS 24:5/18:0e, PI 24:5/18:0, CAEP18:2base/16:0 and CAEP 18:1base/16:0.

Keywords: Total lipid (TL), Polar lipid (PoL), molecular species, phospholipid, ethanolamine glycerophospholipid (PE), choline glycerophospholipid (PC), ceramide aminoethylphosphonate (CAEP), phosphatidylinositol (PI), serine glycerophospholipid (PS).