

FUCOIDAN TỪ RONG NÂU *SARGASSUM SWARTZII*: PHƯƠNG PHÁP TÁCH, HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ VÀ NGHIÊN CỨU CẤU TRÚC

Đến Tòa soạn 19-6-2007

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

¹Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

SUMMARY

The brown seaweed *Sargassum swartzii* was extracted with hydrochloric acid solution, dialyzed through a 1K MWCO membrane and precipitated by Cetavlon to yield polysaccharides. The polysaccharides were dissolved in calcium chloride solution, precipitated in ethanol for obtaining the crude fucoidan (F-SS). The crude fucoidan was fractionated with sodium chloride solution of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 M yielding six fucoidan fractions F05, F10, F15, F20, F25, respectively. The composition of fucoidan fractions including monosaccharides, sulphate, uronic acids and total carbohydrate was analyzed. The distribution of molecular weight of the fucoidan fractions was studied. Ninety percents of both F20 and F25 fractions have the average molecular weight of over 100 kDa. Fraction F-20 showed significant activity against human Rhabdosarcoma cells with an IC_{50} value of 16.6 $\mu\text{g/mL}$ and lung cancer cells of 13.4 $\mu\text{g/mL}$. Fucoidan F25 was against only lung small cancer cells with an IC_{50} value of 13.8 $\mu\text{g/mL}$.

I - MỞ ĐẦU

Fucoidan là polysaccharit sunfat được tách chiết từ rong nâu, có cấu tạo chủ yếu từ α -L-fucose sunfat, ngoài ra còn có D-galactose, D-mannose, D-xylose, L-rhamnose, D-glucose, D-uronic axit và có thể có các gốc axetyl [1, 2]. Fucoidan có hoạt tính chống đông cục máu, kháng khuẩn, kháng virus (kể cả HIV), chống nghẽn tĩnh mạch, chống ung thư, chống viêm khớp, viêm nhiễm, giảm mỡ máu, hạ cholesterol và ức chế miễn dịch có thể sử dụng cho ghép phủ tạng [3 - 6].

Fucoidan không gây độc cho người, có sản phẩm đã được FDA (Cục quản lý thực phẩm, dược phẩm Hoa Kỳ) cấp phép đưa vào làm một thành phần trong thực phẩm chức năng vào năm 2001. Fucoidan trong rong nâu chiếm hàm

lượng rất lớn khoảng 4 - 8% trọng lượng khô. Việt Nam có nguồn tài nguyên rong nâu *Sargassum* rất phong phú, trong đó loài *Sargassum swartzii* (Tun.) C. Agardh là một trong số các loài rong phổ biến ở Việt Nam [7, 8]. Trong các công bố trước đây, chúng tôi đã nghiên cứu thành phần, đặc điểm cấu trúc của fucoidan tách từ năm loài rong nâu *S. polycystum*, *S. mcclurei*, *S. swartzii*, *S. oligocystum* và *S. denticarpum* phổ biến ở miền Trung [8]. Trong bài báo này chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu về việc tách phân đoạn các fucoidan từ loài rong nâu *Sargassum swartzii* (Tun.) C. Agardh trên nhựa lỏng Cetavlon, giải hấp bằng NaCl ở các nồng độ khác nhau. Thành phần và hàm lượng các đường, sunfat, axit uronic, sự phân bố trọng lượng phân tử, đặc điểm cấu trúc và hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của chúng đã được khảo sát, đánh giá.

II - THỰC NGHIỆM

1. Thiết bị và dụng cụ

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (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). Mẫu fucoidan được hoà tan lượng nhỏ trong metanol và đo phổ ESI-MS trên thiết bị LC/MS Agilent 1100 tại Viện Hóa học.

Sắc ký khí được thực hiện 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.

Hệ rây phân tử vivaflow200 có các kích thước rây 5 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa và 100 kDa (MWCO) được lắp nối tiếp.

2. Nguyên liệu

Mẫu rong *Sargassum swartzii* được thu ở tỉnh Khánh Hoà, rửa nhanh bằng nước ngọt và phơi khô tự nhiên. 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 1kDa đến còn khoảng 1 lít.

Quá trình tách fucoidan từ dịch lọc trên bằng cách kết tủa với dung dịch Cetavlon 10% được thực hiện như đã mô tả trong công bố trước đây [8], thu được 40 g fucoidan thô (F-SS).

3. Tách phân đoạn các fucoidan

Fucoidan (5 g) thô được hoà vào 1 lít nước. Vừa khuấy vừa thêm Cetavlon 10% vào đến khi không còn tủa tạo thành (khoảng 60 - 80 ml). Dung dịch được khuấy tiếp trong 20 giờ, sau đó kết tủa được ly tâm lấy ra. Hoà kết tủa vào 600 ml NaCl 0,5 M, khuấy đều để qua đêm, tủa được tách riêng. Dịch lọc được tách muối, đông khô, thu được phân đoạn fucoidan ký hiệu F-05. Tương tự như vậy, hòa kết tủa với các dung dịch NaCl 1, 1,5, 2 và 2,5 M thu được các phân đoạn fucoidan ký hiệu F-10, F-15, F-20 và F-25,

tương ứng.

4. Phân tích thành phần đường của các fucoidan đã tinh chế

Quy trình xác định thành phần đường và hàm lượng sunfat của các fucoidan tinh chế được thực hiện tương tự trong tài liệu [8]. Kết quả được mô tả trong bảng 1.

5. Xác định hàm lượng axit uronic

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

Cho vào ống nghiệm, có chứa sản phẩm fucoidan đã thủy phân, 0,3 ml NaBH_4 0,25 M vừa pha xong 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.

Sản phẩm khô trong ống nghiệm được hoà tan bằng 3 ml nước cất, dung dịch đó được đưa vào cốc có chứa sẵn khoảng 0,3 g nhựa trao đổi ion dạng axetat, khuấy đều trong một giờ, tách lấy phần dịch, lặp lại một lần nữa với khoảng 0,2 g nhựa mới. Nhựa của hai lần khuấy gom lại, rửa bằng nước cất với thể tích gấp khoảng 5 lần thể tích nhựa.

Lacton hóa axit aldonic [9]. Nhựa đã hấp thụ axit aldonic được rửa giải với 2 ml HCl 1 N khuấy 30 phút ở nhiệt độ phòng, nhựa đã giải hấp được lọc bỏ bằng giấy lọc sợi thủy tinh (Whatman GFA). Dịch lọc được bay hơi đến khô ở 40°C trong dòng khí đã được lọc sạch. Giai đoạn bay hơi dung dịch HCl 1 N này đã chuyển hóa axit aldonic thành aldonoalacton. Phần khô trong ống nghiệm được tiếp tục sấy khô trong chân không khoảng 12 giờ có mặt KOH để loại bỏ hoàn toàn HCl.

Aldonoalacton được hoà tan bằng vài giọt natri borat 10 mM, pH = 7,5 và 10 mg NaBH_4 trong 0,5 ml đệm borat. Phản ứng mở vòng lacton diễn ra trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. NaBH_4 được loại bỏ bằng cách cho bay hơi với axit axetic băng đến khô, sau đó thêm 1 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. Sản phẩm thu được là alditol tiếp tục được axetat hóa (anhydrit axetic trong pyridin) như ở phần xác định đường ta thu được alditolaxetat. Alditolaxetat được phân tích bằng sắc ký khí và so sánh với chất chuẩn.

6. Xác định phân bố trọng lượng phân tử của các phân đoạn fucoidan tách trên cetavlon

Các phân đoạn fucoidan F05-F25 được hòa vào nước cất, chạy tách phân đoạn qua hệ thống rây phân tử 5 môđun MWCO, các phân đoạn tương ứng được xác định tổng cacbohydrat bằng cách so màu theo phương pháp axit phenol-sulfuric của Duboi [1]. Trong quá trình lọc rây, các phân đoạn được rửa 3 lần bằng nước cất.

7. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào in vitro

Hoạt tính gây độc tế bào của các phân đoạn fucoidan được thử theo phương pháp của Likhitwitaywid [10] trên các dòng ung thư RD (Rhabdosarcoma - tế bào ung thư màng tim người), LU (tế bào ung thư phổi người) và Hep-G2 (tế bào ung thư gan người). Tác dụng gây độc tế bào của mẫu được đánh giá theo hai giá trị SR (survival rate — tỉ lệ tế bào còn sống) và IC_{50} . Mẫu nào cho giá trị $SR \leq 50\%$ ở nồng độ mẫu 20 mg/ml đối với mẫu thô và 4 mg/ml đối với mẫu tinh khiết được đánh giá có hoạt tính. Mẫu thử có giá trị $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ đối với chế phẩm thô và $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ đối với chế phẩm tinh

được coi là có hoạt tính gây độc tế bào ung thư.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thành phần đường của các phân đoạn fucoidan được tách trên nhựa lỏng Cetavlon với các dung dịch NaCl ở nồng độ khác nhau được xác định bằng sắc ký khí và mô tả trong bảng 1.

Thành phần sunfat của các phân đoạn fucoidan rõ ràng có tỷ lệ tăng theo nồng độ NaCl rửa giải như được thể hiện trên bảng 1. Tỷ lệ tăng này cũng thấy được trên phổ hồng ngoại của 5 phân đoạn F05-F25, dải hấp thụ mạnh thấy ở F10 đến F25 đặc trưng cho dao động kéo của nhóm S=O ở khoảng 1250 cm^{-1} thể hiện sự tồn tại của nhóm este sunfat (trên 20%) trong các fucoidan trên. Dải hấp thụ vừa phải ở vùng 820 cm^{-1} — đặc trưng cho nhóm sunfat liên kết equatorial, thấy rõ ở phân đoạn fucoidan F05 và chuyển dần sang dải hấp thụ 845 cm^{-1} ở fucoidan F25 - đặc trưng cho nhóm sunfat liên kết axial. Như vậy, khi nồng độ NaCl rửa giải cao, nhóm sunfat liên kết axial là chủ yếu. Thành phần galactose trong phân đoạn F-05 tương tự như fucoidan thô (F-SS), trong khi đó lại giảm ở F-10, F-15 và F-20, nhưng lại tăng gấp đôi so với đường L-fucose ở phân đoạn F-25. 96% fucoidan phân đoạn F25 này có trọng lượng phân tử trung bình trên 100 kDa (bảng 2). Hàm lượng axit uronic giảm dần khi tăng dần nồng độ NaCl rửa giải. Phổ hồng ngoại ở vùng hấp thụ $1610 - 1625 \text{ cm}^{-1}$ có cường độ giảm dần theo trật tự này.

Bảng 1: Thành phần đường của các phân đoạn fucoidan tách trên nhựa lỏng Cetavlon

Phân đoạn	Thành phần đường, mol						Tổng cacbohyd., %	SO ₃ Na (%w/w)	Axít Uronic (%w/w)
	Fuc	Xyl	Rha	Man	Glu	Gal			
F-SS [8]	1	0,19	0,48	0,54	0,22	1	N/A	20,40	14,28
	29,15%	5,54%	13,99%	15,74%	6,41%	29,15%			
F-05	1	0	0,72	1,16	0,55	1,23	87,3	8,69	19,94
	21,46%	0%	15,45%	24,89%	11,8%	26,39%			
F-10	1	0,07	0,35	0	0,04	0,17	71,2	22,68	12,99
	61,35%	4,29%	21,47%	0%	2,45%	10,43%			
F-15	1	0,04	0,31	0,38	0,06	0,26	69,5	25,24	13,88
	48,78%	1,95%	15,12%	18,54%	2,93%	12,68%			

Phân đoạn	Thành phần đường, mol						Tổng cacbohyd., %	SO ₃ Na (%w/w)	Axit Uronic (%w/w)
	Fuc	Xyl	Rha	Man	Glu	Gal			
F-20	1	0,04	0,24	0,38	0,07	0,49	70,1	25,42	14,74
	45,05%	1,80%	10,81%	17,12%	3,15%	22,07%			
F-25	1	0,15	0,22	0,4	0,18	2,07	68,3	27,62	9,66
	24,88%	3,73%	5,47%	9,95%	4,48%	51,49%			

Phân bố trọng lượng phân tử của các phân đoạn fucoidan tách trên cetavlon

Bảng 2: Phân bố trọng lượng phân tử của các phân đoạn fucoidan tách bằng cetavlon (% w/w)

Fucoidan	< 10 kDa	10 — 30 kDa	30 — 50 kDa	50 — 100 kDa	> 100 kDa
F-SS	0,17	0,18	1,50	16,10	82,00
F-05	0,79	0,79	3,94	47,24	47,24
F-10	0,29	0,29	2,29	22,86	74,29
F-15	0,12	0,18	1,83	18,35	79,51
F-20	-	-	0,90	9,01	90,09
F-25	-	-	0,16	3,22	96,62

Phân bố trọng lượng phân tử các phân đoạn fucoidan tách trên cetavlon được thể hiện trong bảng 2. Các phân đoạn fucoidan sau khi được tách qua rây phân tử, được xác định hàm lượng polysaccharit bằng phương pháp Duboi [1]. Các phân đoạn fucoidan có phân bố trọng lượng phân tử không giống như fucoidan thô (F-SS) [11]. Các phân đoạn fucoidan có trọng lượng phân tử trung bình tăng dần với độ tăng nồng độ NaCl rửa giải. Các fucoidan tách bằng dung dịch NaCl có nồng độ thấp có trọng lượng phân tử phân bố ít tập trung hơn ở các phân đoạn sử dụng dung dịch NaCl có nồng độ cao hơn. Fucoidan có trọng lượng phân tử dưới 30 kDa được tách với NaCl nồng độ từ 0,5 đến 1,5 M. Qua bảng 2 ta có thể thấy trên 80% fucoidan từ rong *S. swartzii* có trọng lượng phân tử trung bình trên 100 kDa. Tỷ lệ này cao đến 90% ở phân đoạn fucoidan F20 và đến 96% ở F25.

Hoạt tính gây độc tế bào của các phân đoạn fucoidan

Fucoidan thô F-SS và các phân đoạn được

đánh giá tác dụng gây độc tế bào trên *in vitro* với các dòng ung thư gan người Hep-G2 (*Heptonema carcinoma*), ung thư màng tim người RD (Rhabdosarcoma) và ung thư phổi LU (Lung). Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Ta nhận thấy rằng sau khi giải hấp bằng NaCl thì hoạt tính gây độc tế bào của các phân đoạn fucoidan có khác nhau. Các phân đoạn fucoidan F-05, F-10 và F-15 không có hoạt tính gây độc tế bào. Một số tác giả đã quan sát thấy hiện tượng này khi tách phân đoạn fucoidan [12]. Bảng 3 cho thấy chỉ có các phân đoạn giải hấp với dung dịch NaCl nồng độ cao 2 M, 2,5 M mới có hoạt tính, trong đó phân đoạn F-20 có giá trị IC₅₀ nhỏ hơn của mẫu fucoidan thô ban đầu. Có thể dự đoán là fucoidan phân đoạn F-20 với tỉ lệ gốc sunfat cao trên 25% và có nhiều ở vị trí axial-C-4 của đường fucose là yếu tố quan trọng mang lại tác dụng gây độc tế bào của fucoidan. Việc nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc của phân đoạn fucoidan F-20 đang được khảo sát và sẽ được công bố sau.

Bảng 3: Hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của các phân đoạn fucoidan tách bằng dung dịch NaCl trên cetavlon

STT	Fucoidan	Dòng tế bào (Tỉ lệ tế bào còn sống %)			Kết luận
		Hep-G2	RD	LU	
1	DMSO	100±0,0	100±0,0	100±0,0	
2	Chứng (+)	2,05±0,0	1,5±0,02	2,35±0,07	Dương tính
3	F-SS*	5,8	18,7		Dương tính
4	F-05	100,1±0,9	100,6±0,07	89,2±0,1	Âm tính
5	F-10	95,3±1,7	89,5±0,5	99,4±1,8	Âm tính
6	F-15	104,1±0,9	89,5±1,7	69,3±1,08	Âm tính
7	F-20	63,4±1,1	46,5±0,5	44,1±0,7	Dương tính hai dòng
8	F-25	63,8±0,8	53,5±0,6	43,1±0,7	Dương tính một dòng
9	F-20*	> 20	16,6	13,4	Dương tính hai dòng
10	F-25*	> 20	> 20	13,8	Dương tính một dòng

*Tác dụng gây độc tế bào trên 3 dòng tính theo giá trị IC₅₀ (µg/mL).

IV - KẾT LUẬN

3. Trần Đình Toại, Châu Văn Minh. Rong biển

Việc tách phân đoạn fucoidan đã được thực hiện trên cetavlon với các dung dịch NaCl ở các nồng độ khác nhau từ 0,5 đến 2,5 M. Thành phần và hàm lượng đường, sunfat và axit uronic đã được phân tích. Phân đoạn fucoidan F20 có tác dụng kháng hai dòng tế bào ung thư, ung thư phổi và ung thư màng tim người.

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. Maria I. Bilan, Alexey A. Grachev, Alexander S. Shashkov, Nikolay E. Nifantiev and Anatolii I. Usov. Carbohydrate Research, **339**, 511 - 517 (2004).
2. Tatiana N. Zvyagintseva, Nataliya M. Shevchenko, Evgeny L. Nazarenko, Vladimir I. Gorbach, Angela M. Urvantseva, Marina I. Kiseleva, Vladimir V. Isakov. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Vol. 320 (2), 123 - 131 (2005).

- được liệu Việt Nam, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội (2005).
4. Beress A, Wassermann O, Tahhan S, Bruhn T, Beress L, Kraiselburd EN, Gonzalez LV, de Motta GE, Chavez PI. *J. Nat. Prod.*, 56, 478 - 488 (1993).
 5. S. Koyanagi, N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda, H. Shimeno. *Biochemical pharmacology*, 65, 173 - 179 (2003).
 6. Jehan Ara, et al. *Phytotherapy Research*, 13(4), 304 - 307 (1999).
 7. Nguyễn Hữu Đại. *Rong mơ (Sargassaceae) Việt Nam: Nguồn lợi và sử dụng*, Nxb. Nông Nghiệp (1997).
 8. Nguyễn Duy Nhứt, Bùi Minh Lý, Nguyễn Mạnh Cường, Trần Văn Sung. *Tạp chí Hóa học*, T. 46, số 4, 339 - 343 (2007).
 9. Thomas M. Jones and Peter Albersheim. *Plant Physiol.*, 49, 926 - 936 (1972).
 10. Kittisak Likhitwitayawid, Cindy K. Angerhofer, Geoffrey A. Cordell, John M. Pezzuto, and Nijsiri Ruangrunsi. *J. Nat. Prod.*, Vol. 56 (1), 30 - 38 (1993).
 11. Nguyễn Duy Nhứt, tài liệu chưa công bố.
 12. Dararad Choosawad, Ureporn Leggat, Chavaboon Dechsukhum, Amornrat Phongdara and Wilaiwan Chotigeat. *J. Sci. Technol.*, 27(Suppl. 3), 799 - 807 (2005).