

## NGHIÊN CỨU CẤU TRÚC CỦA FUCOIDAN CÓ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO TÁCH TỪ RONG NÂU *SARGASSUM SWARTZII* BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHỔ KHỐI NHIỀU LẦN

Đến Tòa soạn 7-4-2008

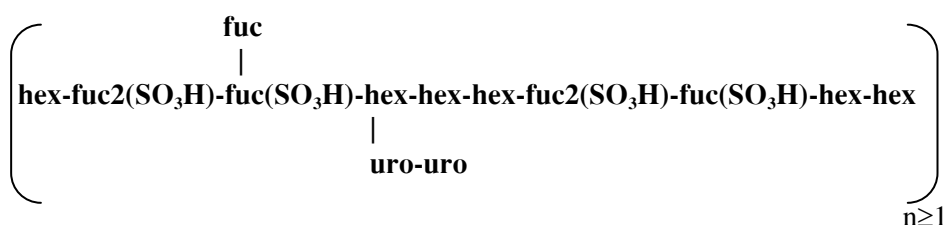
NGUYỄN DUY NHÚT<sup>1</sup>, BÙI MINH LÝ<sup>1</sup>, THÀNH THỊ THU THUY<sup>2</sup>,  
NGUYỄN MẠNH CUỒNG<sup>2</sup>, TRẦN VĂN SUNG<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu và ứng dụng Công nghệ Nha trang, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### ABSTRACT

We reported a study of the structure of cytotoxic fucoidan fraction extracted from brown seaweed *Sargassum swartzii* by using NMR and tandem mass spectrometry in combination with a Pascal software program. Fucoidan F-20 is composed mainly of fucose, accompanied by other monosaccharids (mostly Gal, but also Glc, Rha and Xyl), and significant amount of uronic acids and sulfate. MS/MS analysis showed the cytotoxic fucoidan F-20 has linear sequences of hexose-disulfated fucose-sulfated fucose-hexose. The fucoidan structure is characterized by the branch of two glucuronic acid units linked to the hexose unit and fucose to the sulfated fucose.



**Keywords:** *Sargassum swartzii*, sulfated fucoidan, tandem mass spectrometry, cytotoxic.

### I - MỞ ĐẦU

*Sargassum swartzii* (Turn.) C. Agarth là một loài rong nâu phổ biến ở nước ta, phân bố ở các tỉnh Đà Nẵng, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Bình Thuận và Kiên Giang [1]. Rong *Sargassum swartzii* cao 1- 1,5 m, mọc trên nền san hô chết, ở độ sâu 3 - 4 m, trưởng thành vào các tháng 5 - 6. Trong công bố gần đây, chúng tôi đã nghiên cứu đặc điểm của fucoidan phân tách từ năm loài rong nâu phổ biến ở Việt Nam [2], trong đó có loài *Sargassum swartzii*. Fucoidan tách từ loài rong *Sargassum swartzii* có hoạt tính độc tế

bào với ba dòng tế bào gây ung thư gan, ung thư màng tim và ung thư phổi trên người [3]. Fucoidan này được tách phân bố theo trọng lượng phân tử và xác định thành phân đường, hàm lượng sunfat và axit uronic của các phân đoạn. Chúng tôi đã xác định được phân đoạn fucoidan có hoạt tính độc tế bào (F-20) là phân đoạn chính và có trọng lượng phân tử trung bình trên 100 kDa chiếm trên 90% khối lượng [3].

Việc phân tích cấu trúc của các polysaccharit nói chung và fucoidan nói riêng là một trong những thách thức lớn trong hóa học các chất hữu cơ có gốc đường. Các fucoidan có cấu trúc phức

tạp bao gồm nhiều vấn đề như thành phần các đường đơn, các dạng đồng phân của đường, mức độ phân nhánh và polyme hóa của chúng. Hiện nay, phương pháp sử dụng phổ khối ion hóa bụi electron (ESI-MS) đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm, ứng dụng trong nghiên cứu cấu trúc fucoidan [4 - 7].

Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu cấu trúc của phân đoạn fucoidan F-20 có hoạt tính độc tế bào của loài rong *Sargassum swartzii* bằng phổ khối lượng nhiều lần với kỹ thuật ion hóa phun bụi điện tử ESI-MS-MS, và phương pháp phân tích mảnh ion có sự hỗ trợ bằng chương trình máy tính được xây dựng với ngôn ngữ lập trình Pascal và kết hợp các dữ kiện thực nghiệm hóa học.

## II - THỰC NGHIỆM

### Thiết bị và hoá chất

Phổ  $^1\text{H}$ - và  $^{13}\text{C}$ -NMR đo trên máy Bruker AVANCE 500 tại Viện Hóa học, sử dụng TMS làm chất nội chuẩn với dung môi  $\text{D}_2\text{O}/0.1\% \text{CF}_3\text{COOD}$ .

Phổ hồng ngoại đo trên máy IMPACT 410 của hãng NICOLET (Mỹ).

Phổ khối lượng được đo trên máy LC/MSD Ion Trap 1100 Agilent, kiểu ion hóa dương. Sử dụng nước + axit axetic (1%v/v) làm chất rửa giải.

### Thu và xử lý mẫu rong nâu

#### 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 [3], thu được 40 g fucoidan thô (F-SS).

#### Tách phân đoạn các fucoidan

Fucoidan (5g) thô được hoà vào 1L 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 h, 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. Phân đoạn fucoidan F20 được xác định tỷ lệ trọng lượng phân tử qua hệ thống rây phân tử 5 mô-đun MWCO [3].

## III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Fucoidan phân đoạn F-20 được chiết tách từ rong nâu *Sargassum swartzii*, thành phần đường, hàm lượng sulfat, trọng lượng phân tử đã được công bố trong công trình trước [3]. Thành phần đường của fucoidan F20 bao gồm fucose, xylose, rhamose, manose, glucose và galactose tương ứng với tỷ lệ 45,1; 1,8; 10,8; 17,1; 3,1 và 22,1%.

Phổ hồng ngoại của F-20 có dải hấp thụ mạnh ở vùng  $845 \text{ cm}^{-1}$  cho thấy F-20 có nhóm sunfat liên kết axial chủ yếu ở vị trí C-4, tín hiệu nhỏ lệch về  $820 \text{ cm}^{-1}$  cho thấy có một phân sulfat ở vị trí C-2 hoặc C-3.

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của F-20 cho thấy tín hiệu của proton H-4 (4,2 ppm) luôn ở trường thấp hơn H-2 (3,9 ppm) và H-3 (3,6 ppm) chứng tỏ nhóm sulfat nằm ở vị trí C-4, tín hiệu H-2 ở trường thấp hơn H-3 chứng tỏ tồn tại liên kết đường tại C-2 hoặc C-2 có sulfat và C-3 có liên kết đường hoặc đường fuc ở cuối mạch.

Bằng phương pháp sắc ký, phổ IR và NMR đã cho các thông tin về thành phần đường, kiểu liên kết của các đường trong phân tử fucoidan, nhưng các thông tin về trật tự sắp xếp của các đường cũng như vị trí của nhóm sulfat trong phân tử chưa được xác định, do đó chưa giải thích được các đặc tính sinh học khác nhau của các phân đoạn fucoidan một cách rõ ràng và thuyết phục.

Dựa trên cơ sở nghiên cứu phổ khối MS/MS<sup>n</sup> của fucoidan kết hợp với phần mềm, chúng tôi



890, 874, 732, 590, 556, 517, 487, 451, 488, 427, 413, 376, 340. Các mảnh ion lớn 874, 732, 590, 448 được chọn để tiếp tục bắn phá lần hai, lần 3 thành các mảnh con, mảnh cháu tương ứng ( $MS^2$ ,  $MS^3$ ).

Từ tín hiệu phổ ESI-MS/MS nhiều lần, chúng tôi lập bảng 2 mô tả mảnh ion mẹ và con tương ứng của fucoidan phân đoạn F-20 như sau:

Bảng 2: Các mảnh MS/MS nhiều lần của fucoidan F-20

Mảnh ion mẹ	Mảnh ion con
ESI-MS	940, 890, 874, 794, 765, 732, 726, 690, 557, 516, 479, 448, 413, 374, 360, 330, 277, 232, 185, 165
874	732, 706, 695,...
732	706, 590, 556, 537, 517, 487, 451, 448, 427, 413, 376, 360, 340
590	554, 520, 448, 347, 306,...
448	347, 306, 278, 238, 205, 189, 165
306	238, 205, 201, 189, 165

Sử dụng chương trình NF-10 tìm hợp phần đúng của mảnh ion có số khối 448

Mảnh 448 bị phá vỡ thành các mảnh ion dương sau: 347, 306, 278, 238, 205, 201, 189 và

165. Trong đó, mảnh 165 là mảnh nhỏ nhất được hình thành từ đường đơn fucose chính của fucoidan F-20. Sử dụng chương trình NF-10 tìm được các số khối có hợp phần mảnh tương ứng như trên bảng 3.

Bảng 3: Hợp phần của các mảnh ion con từ ion mẹ m/z 448

Số khối	Hợp phần mảnh ion	Ký hiệu đơn vị cấu trúc	
448.4	$[fuc:2\ hex:2\ uro:1\ sul:1\ -1\ HOH + 1\ Na + H]^{2+}$	448-A	Z4, C0, Y6
448.4	$[fuc:3\ uro:1\ sul:3 + 1\ Na + 1H]^{2+}$	448-B	
347.3	$[fuc:2\ hex:1\ uro:1\ sul:1\ -2\ HOH + 2H]^{2+}$	347-A	
347.3	$[fuc:1\ uro:3 + 2H]^{2+}$	347-B	
347.3	$[fuc:1\ sul:2 + Na]^+$	347-C	
306.2	$[fuc:2\ hex:2\ uro:1\ sul:1\ -HOH + 2Na + H]^{3+}$	306-A	Z4, C0, Y6
306.3	$[fuc:2\ uro:1\ sul:1 + 2Na]^{2+}$	306-B	
306.3	$[fuc:2\ uro:1\ sul:2\ -2\ HOH + 2H]^{2+}$	306-C	
306.6	$[fuc:2\ uro:1\ sul:2\ -2HOH + 2H]^{2+}$	306-D	
306.6	$[fuc:3\ uro:1\ sul:3 + 2Na + H]^{3+}$	306-E	
278.2	$[fuc:1\ hex:2\ sul:1\ -2HOH + Na + H]^{2+}$	278-A	Z3, B1, Y6
278.2	$[fuc:2\ sul:3\ -HOH + Na + H]^{2+}$	278-B	
205.8	$[fuc:1\ hex:2\ sul:1 + 2Na + H]^{3+}$	205-A1	Y3, C1, Y6
205.2	$[fuc:2\ uro:1\ sul:2\ -3HOH + Na + 2H]^{3+}$	205-B	
201.1	$[hex:1\ uro:1 + 2Na]^{2+}$	201-A	
201.1	$[fuc:1\ uro:2\ sul:1\ -HOH + Na + 2H]^{3+}$	201-B	
201.8	$[fuc:3\ sul:2\ -2HOH + Na + 2H]^{3+}$	201-C	
189.2	$[fuc:2\ sul:1\ -2\ HOH + 1\ Na + 1H]^{2+}$	189-A	Z3, B2
165	$[fuc + H]^+$	165-A	Y4, C3

Ta thấy rằng các hợp phần sau 347-C, 306-E, 278-B, 205-B, 189-A và 165-A đều có thể được coi là hợp phần con tách ra được từ

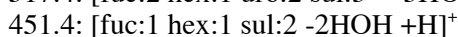
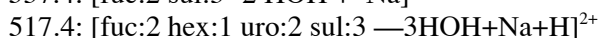
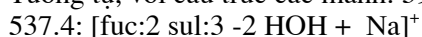
mảnh 448-B. Tuy nhiên, khi đó không thể tồn tại cùng lúc các cấu trúc 278-B, 205-B và 189-A, vì nếu như vậy cần có cấu trúc mạch vòng



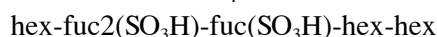
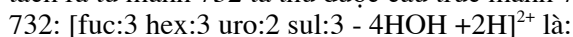
[fuc:2 hex:0 uro:0 sul:3 -2 HOH + 1 Na]<sup>+</sup>. Như vậy, mảnh này có hai hợp phần fuc(SO<sub>3</sub>H)<sub>2</sub> và fuc(SO<sub>3</sub>H) và chúng liên kết trực tiếp với nhau. Như vậy fucoidan F-20 có đặc điểm có đường fucose chứa hai nhóm sunfat gắn với fucose một lần thế sunfat. Như vậy, mảnh ion con có số khối 590: [fuc:3 hex:2 uro:1 sul:3 -1 HOH +2H]<sup>2+</sup> tách ra từ mảnh mẹ 732 có hợp phần



Tương tự, với cấu trúc các mảnh: 590, 448, ... và:



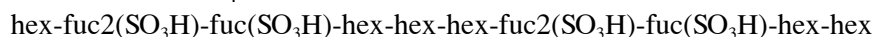
tách ra từ mảnh 732 ta thu được cấu trúc mảnh 732:



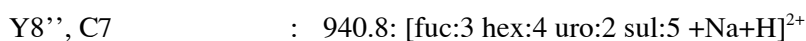
Sơ đồ cắt mảnh 732 cho ra các mảnh ion con được thể hiện trên một phần của hình 2 là:

Y8'', Y7', C5	:	706: [fuc:2 hex:3 uro:2 sul:3+Na +H] <sup>2+</sup>
Z9, Y8'', Y7', B5	:	590: [fuc:3 hex:2 uro:1 sul:3 - HOH +2H] <sup>2+</sup>
Y8, C5	:	556: [fuc:2 hex:2 uro:2 sul:1 +2Na] <sup>2+</sup>
Z9, Z8'', B4	:	517: [fuc:2 hex:1 uro:2 sul:3 -3HOH+Na+H] <sup>2+</sup>
C2	:	487: [fuc:1 hex:1 sul:2 +H] <sup>+</sup>
B2	:	451: [fuc:1 hex:1 sul:2-2HOH+H] <sup>+</sup>
Z9, Y8'', Y8', B4	:	427: [fuc:2 hex:1 uro:1 sul:3 - 2HOH +2H] <sup>2+</sup>
Y8, C3	:	413: [fuc:2 sul:1 +Na ] <sup>+</sup>
Y8, C4, Y8'	:	376: [fuc:2 hex:1 uro:1 sul:1 +Na +H] <sup>2+</sup>
Z8, Y7', B5	:	340: [fuc:2 hex:2 sul:1 -2HOH +2H] <sup>2+</sup>
Y8, Z8', C5	:	306: [fuc:2 hex:2 uro:1 sul:1 -HOH + 2Na+H] <sup>3+</sup>

Mảnh m/z 732 là mảnh con tách ra từ mảnh m/z 874. Lập trình với điều kiện mảnh 732 (x≥3, y≥3, z≥2, t≥3), ta thấy xuất hiện mảnh ion ở m/z 874.4: [fuc:5 hex:6 uro:2 sul:6 +3Na]<sup>3+</sup>. Mảnh này được tạo thành từ khi hai mảnh ion m/z 732 liên kết với nhau tại hex của đầu mạch và hex-hex của cuối mạch, và mất đi một đơn vị fuc và hai đường uro.

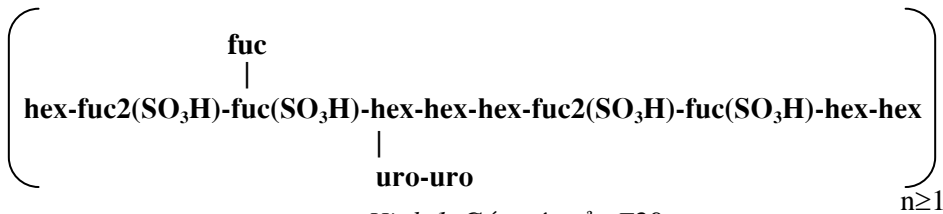


Sơ đồ cắt mảnh của đoạn mạch có số khối 840 thể hiện trên hình 2 là các pic chính của phổ đồ MS<sup>1</sup> phân đoạn F20:

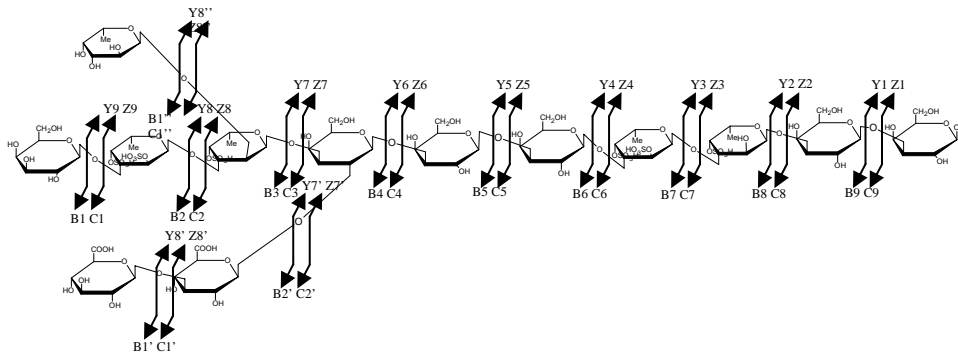


Y8'', Y8, Y7'	: 794.7: [fuc:3 hex:5 sul:4 + 2H] <sup>2+</sup>
Z7', B6	: 765.6: [fuc:3 hex:4 uro:1 sul:3 -2HOH + 2 Na] <sup>2+</sup>
Y8''Y8, Y7', B8	: 726.6: [fuc:3 hex:4 uro:0 sul:4 -HOH + 2Na] <sup>2+</sup>
Y8''Y8, B6	: 690.6: [fuc:2 hex:4 uro:1 sul:3 -HOH + Na + H] <sup>2+</sup>
Z3	: 557.5: [fuc:2 hex:1 sul:1 -HOH + Na] <sup>1+</sup>
Z8, B5	: 516.4: [fuc:2 hex:2 uro:2 sul:1 -2HOH + 2H] <sup>2+</sup>
Z8'', Z7', B8	: 479.9: [fuc:4 hex:4 uro:1 sul:6 -2HOH + 2Na + 2H] <sup>4+</sup>
Y8, C3	: 413.4: [fuc:2 sul:1 + Na] <sup>1+</sup>
Z8'', Z7', B7	: 374.8: [fuc:3 hex:4 sul:5 -3HOH + 2Na + 2H] <sup>4+</sup>
Z7, B5	: 330.3: [hex:2 uro:2 -2HOH + 2H] <sup>2+</sup>
Y8, Y7', C4	: 277.3: [fuc:2 hex:1 sul:1 + 2H] <sup>2+</sup>
Z8'', Z8', Z8, B5	: 232.5: [fuc:1 hex:2 uro:1 sul:1 -4HOH + Na + 2H] <sup>3+</sup>
Y9, C2	: 185.1: [fuc:1 sul:2 + 2Na] <sup>2+</sup>

Vậy cấu trúc đại diện của fucoidan phân đoạn F-20 từ *Sargassum swartzii* được xác định là:



Hình 1: Cấu trúc của F20



Hình 2: Sơ đồ phân mảnh của fucoidan từ F-20

Cho đến nay chưa có tài liệu nào công bố về đặc điểm cấu trúc của fucoidan liên quan tới hoạt tính gây độc tế bào ung thư. Mới chỉ có tài liệu thông báo hoạt tính gây độc tế bào ung thư tăng theo trật tự: fucoidan khử sulfat < fucoidan tự nhiên < fucoidan sunfat hoá [8].

Rong đỏ và rong lục không chứa fucose, thành phần polysaccharit của chúng có mặt hexose và axit uronic [11 - 13], và chúng cũng có hoạt

tính gây độc tế bào ung thư [9, 10]. Từ đó, chúng tôi dự đoán đơn vị cấu trúc: hexose - axit uronic trong phân tử F-20 có thể là nguyên nhân làm cho F-20 có hoạt tính gây độc tế bào ung thư. Đồng thời vị trí nhóm sulfat chủ yếu ở vị trí C-4 cũng có thể làm cho F-20 có hoạt tính gây độc tế bào ung thư (tương tự kappa-carrageenan).

#### IV - KẾT LUẬN

Bằng phương pháp khối phổ nhiều lần kết hợp với phân mềm Pascal, lần đầu tiên cấu trúc hóa học của phân đoạn fucoidan F-20 chiết tách từ rong nâu *Sargassum swartzii* có tác dụng gây độc tế bào ung thư đã được xác định. Fucoidan F-20 có thứ tự cấu trúc thẳng gồm đường hexose-disulfat fucose-sulfat fucose-hexose-hexose. Mạch nhánh gồm fucose-sulfat fucose và diglucuronic acid-hexose.

**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. Nguyễn Hữu Đại, Rong mơ Việt Nam: Nguồn lợi và sử dụng, Nxb. Nông nghiệp (1997).
2. Nguyễn Duy Nhứt, Bùi Minh Lý, Nguyễn Mạnh Cường, Trần Văn Sung, Tạp chí Hóa học, 45(3), 339 - 343 (2007).
3. Nguyễn Duy Nhứt, Bùi Minh Lý, Nguyễn Mạnh Cường, Trần Văn Sung, Tuyển tập các công trình Hội nghị Khoa học và Công nghệ Hoá học hữu cơ toàn quốc lần thứ tư, Hà nội, P. 470-475 (2007).
4. W. L. Zemke-White, and M. Ohno. J. Appl. Phycol., 11, 369 - 376 (1999).
5. Nora M.A. Ponce, Carlos A. Pujol, Elsa B. Damonte, MaríL. Flores, Carlos A. Stortz, Carbohydrate Research Vol. 338, 153 - 165 (2003).
6. Berangere Tissot, Regis Daniel, Carbohydrate Research, 341(5), 598 - 609 (2006).
7. Regis Daniel, Joaquin Abian. Carbohydrate Research, 338(6), 626 - 834 (2007).
8. Park, Jang-Su; Kim, Andre; Kim, Eun-Hee; Suh, Hong-Suk; Choi, Won Chul. Journal of the Korean Chemical Society, 46(2), 151 - 156 (2002).
9. Huamao Yuan and Jinming Song. J. Appl. Phycology, Vol.7, 7 - 13 (2005).
10. Tatiana Seregina, Charles J. link JR., Gabriela Rossi, US patent 20070014775A1 (2007).
11. Betty Matsuhira and Carlos C. Urzóa, Hydrobiologia, Vol. 326 - 327, 491 - 495 (1996).
12. Betty Matsuhira and Luis G. Miller, Bol. Soc. Chil. Quím., 47, 265 - 271 (2002).
13. Maria I. Bilan, Ekaterina V. Vinogradova, Alexander S. Shashkov and Anatolii I. Usov, Carbohydrate Research Vol. 342, 586 - 596 (2007).

Tác giả liên hệ: **Nguyễn Mạnh Cường**

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