

# PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ FUCOXANTHIN MỘT CAROTENOIT CÓ GIÁ TRỊ TỪ RONG NÂU KHÁNH HÒA

Trần Thị Thu Thủy\*, Nguyễn Thị Minh Hằng, Trần Quốc Toàn, Nguyễn Quyết Chiến  
Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

## I. MỞ ĐẦU

Rong biển là sản vật của biển có trữ lượng dồi dào, tiềm ẩn nhiều ích lợi có thể khai thác cho hiện tại và tương lai. Các loài rong biển cung cấp các thành phần có giá trị dinh dưỡng như protein, carbohydrat, lipid và vitamin. Hơn nữa chúng còn chứa nhiều hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học có giá trị, trong đó có các hợp chất carotenoit [1].

Trong số khoảng 600 hợp chất carotenoit tìm thấy trong tự nhiên, gần đây hợp chất fucoxanthin được giới khoa học dành cho nhiều sự quan tâm vì tính năng làm thực phẩm bổ sung, nhưng trước hết vì những phát hiện ở Nhật Bản về khả năng chống bệnh béo phì của nó [2, 3].

Được biết fucoxanthin có trong một số loài rong nâu, đặc biệt là loài rong nâu thực phẩm *Undaria pinnatifida* của Nhật Bản, chúng tôi đã tiến hành khảo sát một số loài rong nâu của Việt Nam. Trong công trình này chúng tôi nghiên cứu việc phân lập fucoxanthin từ một loài rong nâu thu hoạch năm 2008 ở thành phố Nha Trang, Khánh Hòa và nhận dạng nó bằng các phương pháp phổ.

## II. THỰC NGHIỆM

Dung môi chiết và xử lý mẫu đều thuộc loại tinh khiết phân tích, hoặc được chưng cất lại trước khi sử dụng. Dung môi dùng cho sắc ký lỏng cao áp thuộc loại tinh khiết HPLC (Merck). Các hóa chất khác đều thuộc loại tinh khiết phân tích.

Phổ UV-VIS được ghi trên quang phổ kế GC Instrument-2855; Phổ APCI-MS được ghi ở chế độ đo điện tích dương (positive mode) trên máy LC-MS Agilent 1100 series HPLC-DAD (Agilent Technologies, Wilmington, USA); Các phổ NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz (Đức) với dung môi là  $CDCl_3$  và chất chuẩn nội là TMS.

Sắc ký bản mỏng (TLC) được tiến hành trên bản Kieselgel 60 F<sub>254</sub> để nhôm (Merck KGaA, Darmstadt, Đức). Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được chạy trên máy LC-MS Agilent 1100 series HPLC-DAD, cột Zorbax SB-18 (150 x 3mm, 5 $\mu$ m).

### 1. Mẫu rong nâu

Mẫu rong nâu, được thu hái tại vùng biển Khánh Hòa năm 2008 và phơi khô, do TS Bùi Minh Lý, Viện trưởng Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang cung cấp. Có hai mẫu, một mẫu có dạng lá hẹp hình kim, một mẫu có dạng lá rộng.

### 2. Xử lý và chiết nguyên liệu

Mẫu rong nâu khô được rửa sạch, để ráo nước, nghiền nhỏ bằng cách dội  $N_2$  lỏng và nghiền trên cối i-nốc. Sau khi ngâm trong dimethylsulfoxide (DMSO) ở nhiệt độ phòng trong 2-3 phút, nguyên liệu được rửa lại 2 lần bằng nước cất và để ráo nước. Ngâm và chiết nhiều lần trong axeton cho đến khi dịch chiết hầu như không còn màu. Cô cạn bớt dịch chiết (còn 1/2 thể tích),

phân bố lại trong n-hexan/nước. Tách riêng pha hexane, làm khô trên  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  và lọc. Sau khi cô cạn dung môi ở nhiệt độ  $< 40^\circ\text{C}$ , cặn chiết thu được được lọc nhanh qua cột  $\text{MgO/Celite}$  (1/2) để loại bớt chlorophyll rồi đưa lên cột sắc ký silica gel (hệ rửa giải là hexan/axeton gradien nồng độ). Phân đoạn màu vàng đậm có  $R_f = 0,23$  (hexan/axeton: 3/1) được tách riêng, cô cạn và tinh chế trên cột silicagel với hệ dung môi rửa giải là hexan/axeton (4/1-2/1). Phân đoạn có chứa fucoxanthin được thu hồi khi tỷ lệ dung môi giải hấp là 2/1. Sau khi cô cạn dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ  $< 40^\circ\text{C}$ , fucoxanthin thu được được kết tinh lại bằng cách hoà tan trong một lượng tối thiểu axeton, thêm hexan vào cho đến khi dung dịch vẩn đục và làm lạnh dung dịch một cách từ từ nhiệt độ phòng xuống đến  $-20^\circ\text{C}$ . Đnc:  $167-168^\circ\text{C}$ .

**UV-VIS** (hexan)  $\lambda_{\text{max}}$  264, 340, 450 nm.

**IR** (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3440 (OH), 1929 (allene), 1734 (OAc), 1658 (conj. CO) và 1608 (C=C)  $\text{cm}^{-1}$ .

**APCI-MS**  $m/z$  659,9  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,95 (3H, s, H-16); 1,03 (3H, s, H-17); 1,06 (3H, s, 17'); 1,21 (3H, s, H-18); 1,34 (3H, s, H-18'); 1,34 (1H, m, H-2 ax); 1,38 (3H, s, H-16'); 1,42 (1H, m, H-2' ax); 1,49 (1H, m, H-2 eq); 1,51 (1H, t,  $J = 12$  Hz, H-4' ax); 1,78 (1H, dd, H-4 ax); 1,80 (3H, s, H-19'); 1,93 (3H, s, H-19); 1,98 (6H, s, H-20, 20'); 1,99 (1H, m, H-2' eq); 2,03 (3H, s, H-22'); 2,26-2,33 (2H, m, H-4 & 4' eq); 2,60 & v 3,65 (2x1H, d,  $J = 18$  Hz, H-7); 3,80 (1H, m, H-3); 5,37 (1H, m, H-3'); 6,04 (1H, s, H-8'); 6,11 (1H, d,  $J = 11$  Hz, H-10'); 6,26 (1H, d,  $J = 11,5$  Hz, H-14'); 6,34 (1H, d,  $J = 15$  Hz, H-12'); 6,40 (1H, d,  $J = 11,5$  Hz, H-14); 6,57 (1H, dd,  $J = 11; 15$  Hz, H-11); 6,60 (1H, dd,  $J = 11$  Hz, H-11'); 6,63 (1H, dd,  $J = 14; 11,5$  Hz, H-15); 6,67 (1H, d,  $J = 15$  Hz, H-12); 6,74 (1H, dd,  $J = 14; 11,5$  Hz, H-15'); 7,14 (1H, d,  $J = 11$  Hz, H-10).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11,80 ( $\text{CH}_3$ , C-19); 12,73 ( $\text{CH}_3$ , C-20); 12,88 ( $\text{CH}_3$ , C-20'); 13,98 ( $\text{CH}_3$ , C-19'); 21,13 ( $\text{CH}_3$ , C-18); 21,37 ( $\text{CH}_3$ , C-22'); 25,01 ( $\text{CH}_3$ , C-16); 28,11 ( $\text{CH}_3$ , C-17); 29,18 ( $\text{CH}_3$ , C-16'); 31,23 ( $\text{CH}_3$ , C-18'); 32,06 ( $\text{CH}_3$ , C-17'); 35,14 (C, C-1); 35,75 (C, C-1'); 40,80 ( $\text{CH}_2$ , C-7); 41,65 ( $\text{CH}_2$ , C-4); 45,26 ( $\text{CH}_2$ , C-4'); 45,44 ( $\text{CH}_2$ , C-2'); 47,09 ( $\text{CH}_2$ , C-2); 64,25 (CH, C-3); 66,16 (C, C-5); 67,11 (C, C-6); 68,05 (CH, C3'); 72,62 (C, C-5'); 103,35 (CH, C-8'); 117,51 (C, C-6'); 123,36 (CH, C-11); 125,67 (CH, C-11'); 128,50 (CH, C-10'); 129,40 (CH, C-15); 132,14 (CH, C-14'); 132,48 (CH, C-15'); 132,52 (C, C-9'); 134,52 (C, C-9); 135,39 (C, C-13); 136,61 (CH, C-14); 137,07 (CH, C-12'); 138,04 (C, C-13'); 139,07 (CH, C-10); 145,01 (CH, C-12); 170,43 (C=O, C-21'); 197,86 (C=O, C-8); 202,35 (=C=C, C-7').

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Chiết tách và tinh chế fucoxanthin

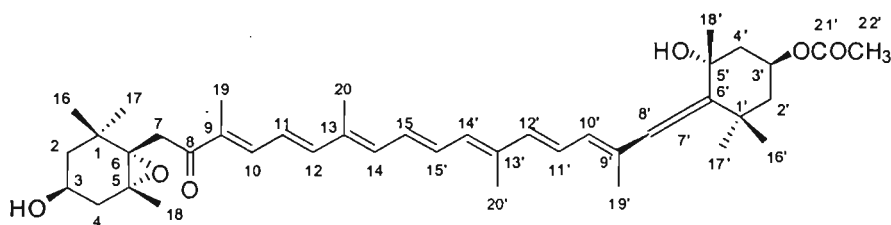
Năm 2008, chúng tôi nhận được hai mẫu rong nâu thu hoạch ở vùng biển Khánh Hòa, một mẫu có dạng lá hẹp hình kim, một mẫu có dạng lá rộng. Để phát hiện sự có mặt của carotenoit, các mẫu được chiết xuất thử với các dung môi khác nhau, dịch chiết được kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng, các carotenoit được nhận biết trên bản mỏng bởi màu sắc tự nhiên, sự hiện màu dưới đèn UV, và sự hiện màu bằng thuốc thử ceri sunphat. Kết quả cho thấy, chỉ khi sử dụng dung môi chiết là DMSO kết hợp với axeton chúng tôi mới phát hiện thấy sự có mặt của một lượng đáng kể carotenoit trong mẫu rong nâu lá rộng, thành phần chủ yếu là fucoxanthin. Lượng carotenoit phát hiện thấy trong mẫu lá hẹp, hình kim thấp hơn nhiều. Vì thế, mẫu rong nâu lá rộng được sử dụng làm nguyên liệu để chiết tách fucoxanthin.

Quá trình chiết mẫu rong nâu như được mô tả trong phần thực nghiệm cho dịch chiết carotenoit thô. Tiếp theo, dịch chiết được cô lại rồi phân bố trong n-hexan/nước, các carotenoit tập trung trong pha hexan. Sau khi cô cạn dung môi ở nhiệt độ  $< 40^\circ\text{C}$ , cặn chiết thu được được

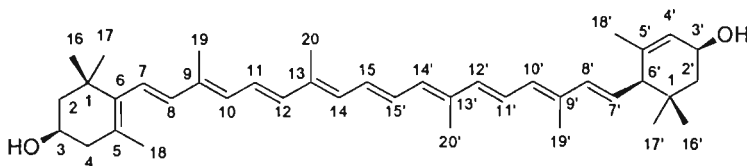
lọc nhanh qua cột MgO/Celite (1/2) để loại bớt chlorophyll rồi đưa lên cột sắc ký silica gel (hệ rửa giải là hexan/axeton, gradient nồng độ). Phân đoạn màu vàng đậm có  $R_f = 0,23$  (hexan/axeton 3:1) được tách riêng, cô cạn và tinh chế trên cột silicagel với hệ dung môi rửa giải là hexan/axeton (chế độ gradient 4/1 - 2/1). Phân đoạn có chứa fucoxanthin được thu hồi khi tỷ lệ dung môi giải hấp là 2/1. Fucoxanthin thô được kết tinh lại trong hexan/axeton, kết quả thu được tinh thể hình kim, màu vàng, đnc. 167-168°C.

## 2. Nhận dạng fucoxanthin bằng các phương pháp phổ

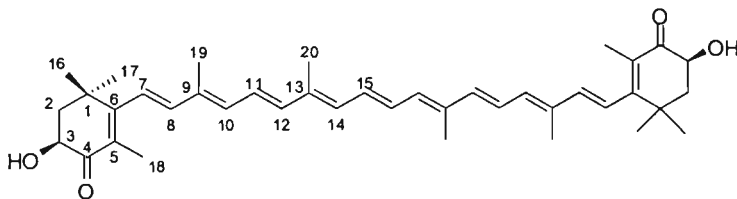
Fucoxanthin là một hợp chất carotenoid, có công thức phân tử là  $C_{42}H_{58}O_6$ , tên hệ thống là (3S,3'S,5R,5'R,6S,6'R)-3'-(acetyloxy)-6',7'-didehydro-5,6-epoxy-5,5',6,6',7,8-hexahydro-3,5'-dihydroxy-8-oxo- $\beta,\beta$ -carotene. Fucoxanthin có cùng khung cấu trúc với các carotenoid  $\beta$ -caroten, lutein, zeaxanthin, astaxanthin, ..., đặc trưng bởi hai vòng 1,1,5-trimethylcyclohexan gắn ở hai đầu của một mạch hờ gồm 4 đơn vị isopren nối liên tiếp với nhau theo kiểu đuôi - đầu - đuôi - đầu - đuôi - đầu - đuôi. Ngoài hệ polyen liên hợp của mạch hờ, fucoxanthin có các yếu tố cấu trúc đặc trưng là liên kết epoxy giữa C-5 và C-6, liên kết allen giữa C-7', C-6' và C-8'. Các yếu tố cấu trúc khác là: hai nhóm OH ở C-3 và C-5', một nhóm C=O ở C-8, và một nhóm acetoxy ở C-3'. Fucoxanthin có 5 cacbon bất đối ở C-3, 3', -5, -5', -6, và một trung tâm chiral ở C-6', -7', -8' xung quanh liên kết allen. Hợp chất lutein có nhiều yếu tố cấu trúc phù hợp với fucoxanthin, có thể dùng để so sánh khi giải cấu trúc.



Fucoxanthin

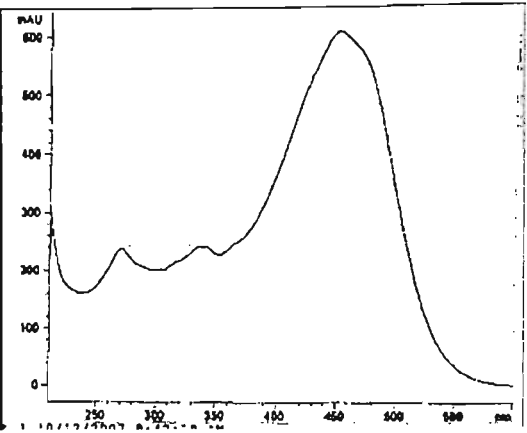


Lutein

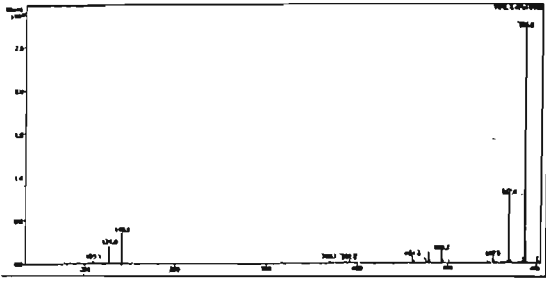


Astaxanthin

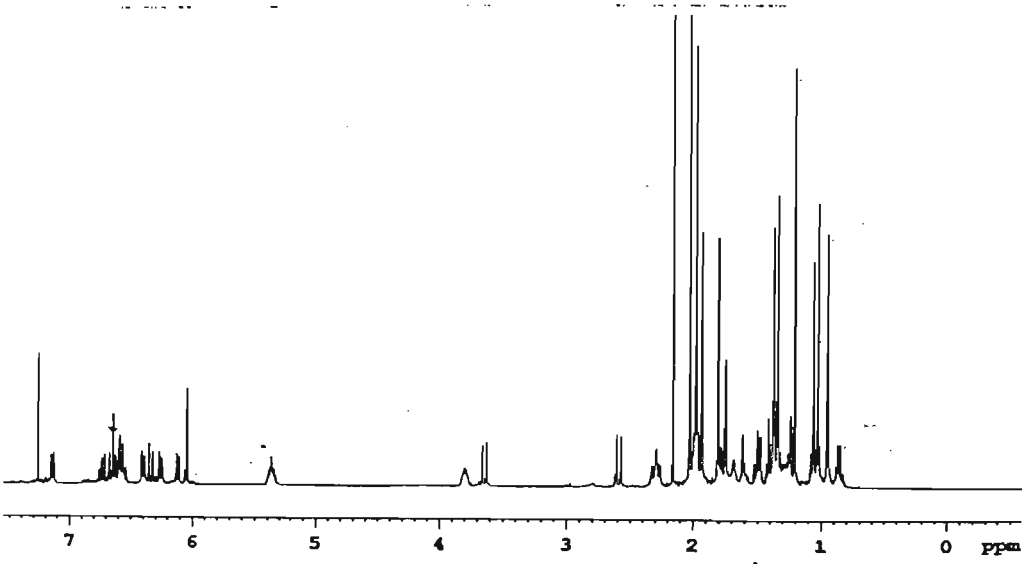
Để nhận dạng fucoxanthin thu được, chúng tôi ghi các phổ UV, MS, 1D và 2D NMR. Kết quả ghi phổ được trình bày trên các hình: Hình 1 (phổ UV), Hình 2 (phổ EI-MS), Hình 3 (phổ  $^1H$  NMR), Hình 4 (phổ  $^{13}C$  NMR), Hình 5 (phổ COSY), Hình 6 (phổ HMBC).



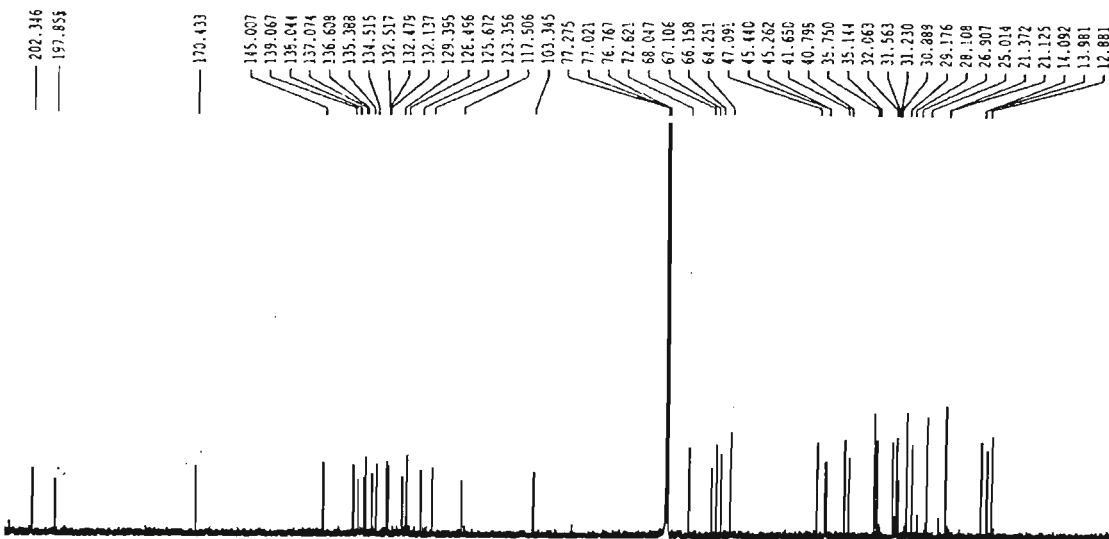
Hình 1. Phổ UV của mẫu fucoxanthin thu được.



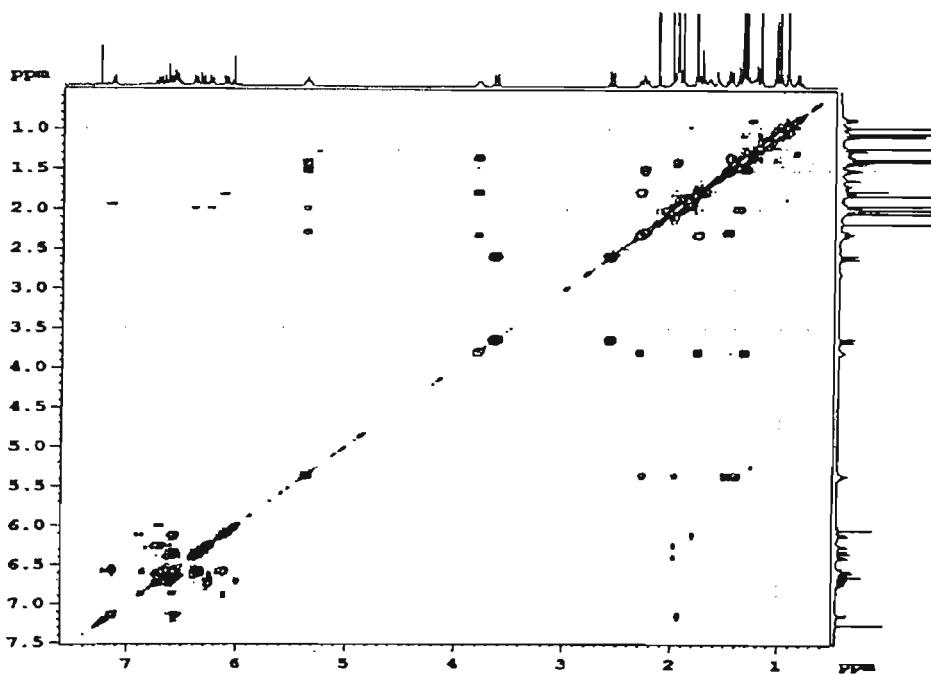
Hình 2. Phổ MS của mẫu fucoxanthin thu được.



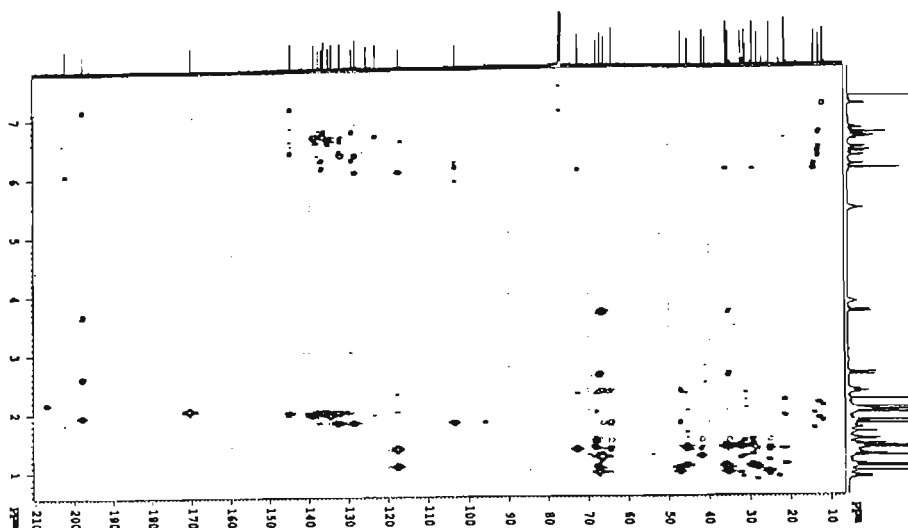
Hình 3. Phổ 1H NMR (500 MHz, CDCl3) của mẫu fucoxanthin thu được.



Hình 4. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) của mẫu fucoxanthin thu được.



Hình 5. Phổ COSY của mẫu fucoxanthin thu được.



Hình 6. Phổ HMBC của mẫu fucoxanthin thu được.

Kết quả gán phổ NMR được trình bày trên bảng 1. Các dữ kiện phổ thu được phù hợp với các dữ kiện đã được công bố [4, 5, 6, 7, 8].

Bảng 1. Số liệu phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) và  $^{13}\text{C}$  NMR của Fucoxanthin trong  $\text{CDCl}_3$

C		$\delta_{\text{H}}$ (J=Hz)	$\delta_{\text{C}}$	C		$\delta_{\text{H}}$ (J=Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	C		35,14	1'	C		35,75
2	$\text{CH}_2$	1,34m (ax) & 1,49m (eq)	47,09	2'	$\text{CH}_2$	1,42m (ax) & 1,99m (eq)	45,44
3	CH	3,80m	64,25	3'	CH	5,37m	68,05
4	$\text{CH}_2$	1,78 dd (ax) & 2,33m (eq)	41,65	4'	$\text{CH}_2$	1,51 t (12, ax) & 2,33m (eq)	45,26
5	C		66,16	5'	C		72,62
6	C		67,11	6'	C		117,51
7	$\text{CH}_2$	2,60 & 3,65 d (18)	40,80	7'	C		202,35
8	C=O		197,86	8'	CH		103,35
9	C		134,52	9'	C		132,52
10	CH	7,14 d (11)	139,07	10'	CH	6,11 d (11)	128,50
11	CH	6,57 dd (11; 15)	123,36	11'	CH	6,60 dd (11)	125,67
12	CH	6,67 (15)	145,01	12'	CH	6,34 (15)	137,07
13	C		135,39	13'	C		138,04
14	CH	6,40 d (11,5)	136,61	14'	CH	6,26 d (11,5)	132,14
15	CH	6,63 (11,5; 14)	129,40	15'	CH	6,74 (11,5; 14)	132,48
16	$\text{CH}_3$	0,95 s	25,01	16'	$\text{CH}_3$	1,38 s	29,18
17	$\text{CH}_3$	1,03 s	28,11	17'	$\text{CH}_3$	1,06 s	32,06
18	$\text{CH}_3$	1,21 s	21,13	18'	$\text{CH}_3$	1,34 s	31,23
19	$\text{CH}_3$	1,93 s	11,80	19'	$\text{CH}_3$	1,80 s	13,98
20	$\text{CH}_3$	1,98 s	12,73	20'	$\text{CH}_3$	1,98 s	12,88
				21'	C=O		170,3
				22'	$\text{CH}_3$	2,03 s	21,37

Tư liệu khoa học cho biết fucoxanthin là chất màu đi kèm trong thể lục lạp của rong nâu và hầu hết các loài tảo heterokont, làm cho chúng có màu nâu và xanh lá cây thẫm. Fucoxanthin là một hợp chất thiên nhiên có tiềm năng ứng dụng vì có nhiều hoạt tính đáng chú ý. Giống như một số carotenoit khác, fucoxanthin có hoạt tính chống oxy hóa [9]. Đối với bệnh ung thư, một số nghiên cứu cho thấy fucoxanthin xúc tiến có hiệu quả quá trình apoptosis trong các tế bào bạch cầu và ung thư ruột kết [10, 11], ức chế mạnh quá trình tăng trưởng của các tế bào ung thư tuyến tiền liệt [12]. Các nghiên cứu về sự chuyển hóa và tính chất dinh dưỡng trên chuột của trường ĐH Hokkaido cho thấy fucoxanthin xúc tiến quá trình "đốt cháy" chất béo trong các tế bào mỡ của mô adipose nhờ cơ chế tăng cường biểu hiện của enzym thermogenin thực hiện quá trình sinh nhiệt [2]. Hoạt tính này liên quan chặt chẽ với sự có mặt của nhóm allen trong cấu trúc của fucoxanthin. Một nghiên cứu gần đây trên chuột cho thấy, thức ăn có bổ sung 0,1 và 0,2% fucoxanthin làm cho glucose trong máu và lượng mô mỡ trắng (WAT) khoang bụng giảm rõ rệt [13]. Chìa khóa cho các hoạt tính này của fucoxanthin là khả năng xúc tiến UCP1, điều hòa PPAR $\gamma$  và  $\beta_3$ -AR trong WAT, cũng như tiết chế các adipokine như TNF- $\alpha$  [9].

Trong một số công trình nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã nghiên cứu astaxanthin và một số carotenoit khác trong hải sản của Việt Nam [14, 15]. Với việc phân lập được fucoxanthin từ rong nâu, chúng tôi hy vọng đóng góp thêm được một phần cho việc nghiên cứu khai thác nguồn hợp chất thiên nhiên có giá trị này. Chúng tôi cũng mong muốn tiếp tục việc nghiên cứu để tìm ra fucoxanthin với hàm lượng cao trong các loài rong nâu và rong biển khác của Việt Nam, cũng như xây dựng được các phương pháp phân tích chính xác và tiện lợi để định lượng chúng trong nguyên liệu.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả chân thành cảm ơn TS Bùi Minh Lý và các cộng sự của Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang đã thu thập và cung cấp các mẫu rong nâu Khánh Hòa. Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ tài chính của Hội đồng khoa học tự nhiên.

#### IV. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Đình Toại, Châu Văn Minh, Rong biển dược liệu Việt Nam, Nxb Khoa học Kỹ thuật 2005.
2. Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K, Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **332**(2), 392-7.
3. Maeda H, Tsukui T, Sashima T, Hosokawa M, Miyashita K, Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient, *Asia Pac J Clin Nutr.*, 2008, **17** Suppl 1, 196-9.
4. J. A. Haugan, T. Aakermann, S. Liaaen-Jensen, Isolation of Fucoxanthin and Peridinin, *Methods Enzymol.*, 213, 231-245 (1992).
5. X. Yan, Y. Chuda, M. Suzuki, T. Nagata, Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63** (3), 605-607 (1999).
6. J. A. Haugan, S. Liaaen-Jensen, Improved isolation procedure for fucoxanthin, *Phytochemistry*, **28** (10), 2797-2798 (1989).
7. G. Englert, T. Bjorland, S. Liaaen-Jensen - 1D and 2D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthin series, *Magne. Res. Chem.*, **28**, 519-528 (1990).
8. Y. Yamano, C. Tode, M. Ito - Carotenoids and related polyenes. Part 3. First total synthesis of fucoxanthin and halocynthiaxanthin using oxo-metallic catalyst, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1895 -1904 (1995).

9. Y. Mine, (Editor), K. Miyashita (Editor), F. Shahidi (Editor), *Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease: Food Factors and Gene Interactions*, Wiley-Blackwell 2009, pp. 145 - 160.
10. Kotake-Nara E, Terasaki M, Nagao A., Characterization of apoptosis induced by fucoxanthin in human promyelocytic leukemia cells, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2005, 69(1), 224-7.
11. Das SK, Hashimoto T, Shimizu K, Yoshida T, Sakai T, Sowa Y, Komoto A, Kanazawa K., Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1, *Biochim Biophys Acta.*, 2005, 1726(3), 328-35.
12. Kotake-Nara E, Kushiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita K, Nagao A., Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells, *J. Nutr.*, 2001, 131(12), 3303-6.
13. Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Miyashita K, Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice, *J Agric Food Chem.*, 2007, 55(19), 7701-6.
14. Hoàng Thị Huệ An, Trần Thị Thu Thủy, Nguyễn Quyết Chiến - Phân lập và tinh chế Astaxanthin từ vỏ tôm, *Tạp chí Hoá học*, 45(6A), 226-230 (2007).
15. Lê Lan Anh, Nguyễn-Quyết Chiến, Hoàng Thị Huệ An - Định lượng carotenoid trong một số loài giáp xác thủy sản Việt Nam bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Hoá học*, 45(6A), 269-274 (2007).

## SEGREGATING AND REFINING FUCOXANTHIN - A VALUEABLE CAROTENOIT FROM PHAEOPHYTE IN KHANH HOA PROVINCE

*Tran Thi Thu Thuy, Nguyen Thi Minh Hang, Tran Quoc Toan, Nguyen Quyet Chien*

### SUMMARY

From a species of brown seaweed collected in the sea of province Khanh-Hoa of Vietnam fucoxanthin has been isolated, purified and characterized by UV, MS, 1D and 2D NMR spectroscopy.

*Key words:* fucoxanthin, brownseaweed, Khanh-Hoa Vietnam.