

XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN CHIẾT THÍCH HỢP ĐỂ THU NHẬN BROMOPHENOLS TỪ RONG ĐỎ *LAURENCIA INTERMEDIA* YAMADA

● NGUYỄN THẾ HÂN - NGUYỄN VĂN MINH - PHẠM THỊ HIỀN - VŨ LỆ QUYÊN

TÓM TẮT:

Bromophenols là nhóm chất có hoạt tính sinh học tiềm năng có thể sử dụng trong ngăn ngừa và điều trị nhiều loại bệnh. Rong biển được chứng minh là nguồn nguyên liệu giàu bromophenols. Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của điều kiện chiết đến hiệu quả thu nhận bromophenols từ rong đỏ *Laurencia intermedia* Yamada. Điều kiện chiết thích hợp được xác định như sau: Dung môi chiết, tỷ lệ dung môi chiết/nguyên liệu, nhiệt độ chiết, thời gian chiết lần lượt là: 75% methanol, 40/1 (ml/g), 80°C và 90 phút. Kết quả định tính cho thấy, dịch chiết rong có các nhóm chất: phenolics, flavonoids, terpenoids, carotenoids, saponins và tannins.

Từ khóa: Bromophenols, *Laurencia intermedia* Yamada, điều kiện chiết, tỉnh Khánh Hòa.

1. Mở đầu

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới với bờ biển trải dài 3.260 km và diện tích mặt nước rộng hơn 1.000.000 km², đây là những điều kiện tự nhiên thuận lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của các loài rong biển. Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh rằng rong biển có chứa nhiều hợp chất sinh học quan trọng. Trong số đó, bromophenols được chứng minh là có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng và có tiềm năng sử dụng trong thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm. Những hoạt tính sinh học của bromophenols đã được nghiên cứu là kháng tế bào ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn và điều trị các bệnh về tim mạch. Nhiều chất thuộc nhóm bromophenols đã được tìm thấy trong cả ba chi

rong đỏ, rong nâu và rong lục thu nhân tại các vùng biển khác nhau trên thế giới. Trong đó, các loài rong đỏ thường có hàm lượng bromophenols cao hơn so với rong nâu và rong lục [1]. Cho đến nay, các công trình nghiên cứu về rong biển ở Việt Nam chủ yếu tập trung vào thu nhận một số hợp chất có hàm lượng lớn như alginate và agar-agar. Gần đây, một số nghiên cứu đã bước đầu thu nhân các hợp chất có hoạt tính sinh học như fucooidan, phlorotannins và polyphenols [2,3]. Tuy nhiên, những nghiên cứu về nhóm chất bromophenols từ các loài rong biển thu hoạch tại vùng biển Khánh Hòa nói riêng và Việt Nam nói chung còn rất hạn chế.

Hiệu suất chiết các hợp chất tự nhiên phụ thuộc vào điều kiện chiết (dung môi, tỷ lệ dung

môi/nguyên liệu, nhiệt độ chiết và thời gian chiết...). Những công bố trước đây chỉ sử dụng môi điều kiện chiết nhất định để thu nhận bromophenols từ rong biển, đây có thể chưa phải là điều kiện chiết thích hợp. Do đó, để có cơ sở cho việc xây dựng quy trình thu nhận bromophenols từ rong biển, cần nghiên cứu điều kiện chiết thích hợp. Chi rong *Laurencia* được tìm thấy phổ biến tại các vùng biển của Việt Nam, một số chất thuộc nhóm bromophenols có hoạt tính sinh học đã được tìm thấy trong chi rong này [4].

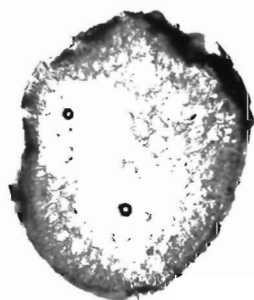
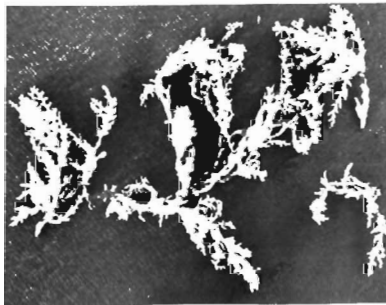
Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định điều kiện chiết thích hợp để thu nhận dịch chiết giàu bromophenols từ rong đỏ *Laurencia intermedia* Yamada thu hoạch tại vùng biển Khánh Hòa.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Mẫu rong biển và hóa chất

Rong đỏ *Laurencia intermedia* Yamada được thu nhận tại vùng biển Khánh Hòa từ tháng 5 - 7/2017 (Hình 1). Mẫu rong được định danh bởi ThS. Đỗ Anh Duy (Viện Nghiên cứu Hải sản, Hải Phòng). Sau khi thu nhận, rong được rửa sạch bằng nước biển và làm khô bằng phương pháp sấy lạnh ở nhiệt độ 40°C, đến độ ẩm dưới 13%. Rong khô được bao gói chân không trong bao bì PA để sử dụng cho các nghiên cứu. Thuốc thử Folin-Ciocalteu được cung cấp bởi Công ty Sigma (Hoa Kỳ). Các hóa chất khác sử dụng trong nghiên cứu đều đạt hạng phân tích. (Hình 1)

Hình 1: Hình thái (A) và hình cắt ngang quan sát dưới kính hiển vi (B) mẫu rong *Laurencia intermedia* Yamada sử dụng trong nghiên cứu



2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện chiết bromophenols

Ảnh hưởng của điều kiện chiết hàm lượng bromophenols thu nhận được xác định bằng phương pháp cổ điển đơn yếu tố. Cụ thể như sau:

- *Lựa chọn hệ dung môi chiết*: Rong nguyên liệu được chiết trong dung môi methanol/nước (0, 25, 50, 75 và 100%, v/v). Cố định các thông số: nhiệt độ chiết, thời gian chiết và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu.

- *Lựa chọn tỷ lệ dung môi/nguyên liệu*: Rong nguyên liệu được chiết trong dung môi lựa chọn từ thí nghiệm trên. Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (ml/g) nghiên cứu: 10/1, 20/1, 30/1, 40/1 và 50/1. Cố định các thông số còn lại: nhiệt độ chiết và thời gian chiết.

- *Lựa chọn nhiệt độ chiết*: Rong nguyên liệu được chiết trong dung môi, với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu lựa chọn từ các thí nghiệm trên. Các nhiệt độ chiết nghiên cứu: 35, 50, 65, 80 và 95°C. Cố định thời gian chiết.

- *Lựa chọn thời gian chiết*: Rong nguyên liệu được chiết trong dung môi, với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và nhiệt độ chiết lựa chọn từ các thí nghiệm trên. Các thời gian chiết nghiên cứu: 30, 60, 90, 120 và 150 phút.

2.3. Phương pháp xác định hàm lượng bromophenols tổng

Bromophenols trong rong biển được chiết theo

phương pháp của Zhang và cộng sự (2017) [5]. Hàm lượng bromophenols tổng số được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Folin - Ciocalteu [6].

2.4. Định tính một số thành phần trong dịch chiết

Sau khi chiết ở điều kiện chiết thích hợp, một số thành phần trong dịch chiết rong (phenolics, flavonoids, terpenoids, carotenoids, saponins và tannins) được định tính. Nguyên tắc của phương pháp định tính này là dựa trên phản ứng đặc hiệu của chất phân tích và thuốc thử. Mỗi thí nghiệm định tính tiến hành như sau: Lấy 0,5 ml dịch chiết rong cho vào ống nghiệm có chứa 1,5 ml chất nhận biết. Tiếp theo, quan sát màu của dung dịch để nhận biết các nhóm chất theo Yadav và cộng sự (2014) [7].

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện 3 lần độc lập. Kết quả của thí nghiệm được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Giá trị trung bình được phân tích ANOVA theo phép thử Duncan, giá trị $p < 0,05$ chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê sử dụng phần mềm Stansucal Product and Services Solutions (SPSS) 16.0.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết

Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết (methanol) đến hàm lượng bromophenols tổng số của mẫu rong nghiên cứu được trình bày ở Hình 2. Kết quả cho thấy, nồng độ dung môi chiết ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng các p chất

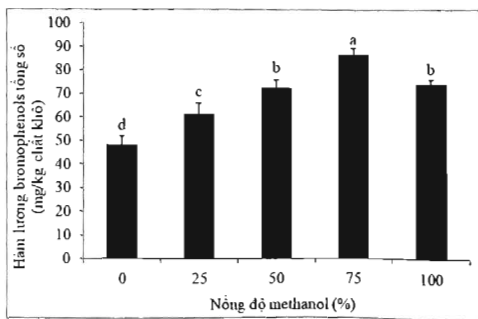
bromophenols. Khi tăng nồng độ methanol từ 0 đến 75%, hàm lượng bromophenols tổng số tăng lên từ 48,44 đến 87,08 mg/kg khối lượng khô. Tiếp tục tăng nồng độ methanol lên 100%, hàm lượng bromophenols tổng số giảm xuống còn 74,39 mg/kg khối lượng khô.

Trong những nghiên cứu trước đây về thu nhận bromophenols từ rong biển, các tác giả thường sử dụng một loại dung môi nhất định. Acetone, ethanol và methanol hoặc hỗn hợp của các dung môi này trong nước (thường là 80%), thường được sử dụng để chiết các hợp chất bromophenols [4,8,9]. Trong nghiên cứu này, các nồng độ dung môi methanol khác nhau được nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu bước đầu này có thể thấy 75% methanol cho hiệu quả chiết các chất bromophenols từ rong là tốt nhất trong khoảng nồng độ dung môi nghiên cứu. (Hình 2)

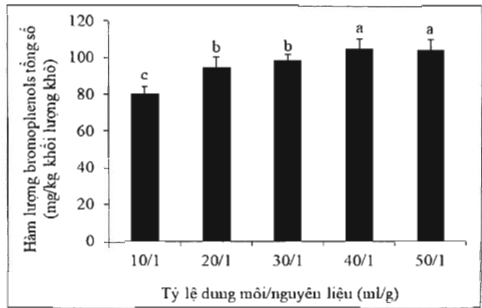
3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi chiết/nguyên liệu

Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu đến hàm lượng bromophenols được thể hiện ở Hình 3. Kết quả nghiên cứu cho thấy dung môi chiết/nguyên liệu 40/1 (ml/g) là thích hợp cho quá trình chiết để thu được hàm lượng cao nhất bromophenols. Tỉ lệ này cho hàm lượng bromophenols (104,96 mg/kg khối lượng khô) cao hơn đáng kể so với chiết ở tỉ lệ 10/1 và 20/1 (ml/g). Chiết ở tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu 50/1 không làm tăng đáng kể hàm lượng bromophenols ($p > 0,05$). Từ những kết quả đạt được, tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu là 40/1 (ml/g) được lựa chọn cho những thí nghiệm tiếp theo. (Hình 3)

Hình 2: Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết methanol đến hàm lượng bromophenols trong dịch chiết rong *Laurencia intermedia* Yamada. Các chữ cái khác nhau chỉ sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)



Hình 3: Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng bromophenols trong dịch chiết rong *Laurencia intermedia* Yamada. Các chữ cái khác nhau chỉ sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

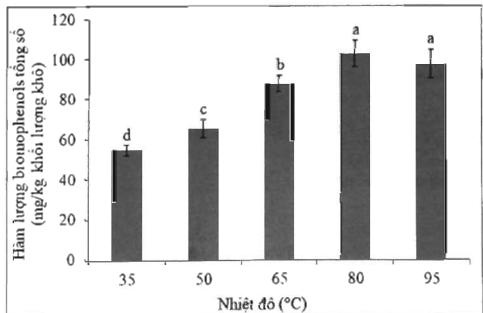


3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng bromophenols tổng số của loài rong nghiên cứu được thể hiện ở Hình 4. Kết quả cho thấy, nhiệt độ chiết ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng các hợp chất bromophenols tổng số. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng bromophenols như sau: Khi nhiệt độ chiết tăng từ 35 lên 80°C, hàm lượng bromophenols tăng mạnh từ 54,78 đến 102,65 mg/kg khối lượng khô. Tiếp tục tăng nhiệt độ lên 95°C hàm lượng bromophenol giảm nhẹ xuống còn 97,46 mg/kg nguyên liệu khô và không có sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê với hàm lượng bromophenols tổng số khi chiết ở nhiệt độ

80°C ($p > 0,05$). Cho đến nay, những nghiên cứu về điều kiện chiết độ thích hợp để thu nhận bromophenols từ rong biển còn rất hạn chế. Một số nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số trong dịch chiết từ thực vật cho kết quả tương tự với nghiên cứu này. Ví dụ, Bucic-Kojic và cộng sự (2011) [10] khi nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số của trái vả (*Ficus Carica* L.), cho thấy hàm lượng tăng lên từ 2,50 đến 3,70 mg GAE/g chất khô khi tăng nhiệt độ chiết từ 25 lên 80°C. Như vậy, 80°C được lựa chọn là nhiệt độ thích hợp nhất trong khoảng nhiệt độ nghiên cứu. (Hình 4)

Hình 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng bromophenols trong dịch chiết rong *Laurencia intermedia* Yamada. Các chữ cái khác nhau chỉ sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)



3.4. Ảnh hưởng của thời gian chiết

Bên cạnh nhiệt độ và dung môi chiết, thời gian cũng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả chiết các hợp chất sinh học từ nguyên liệu tự nhiên. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng bromophenols tổng số của rong được thể hiện ở Hình 5. Kết quả cho thấy, thời gian chiết ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng các chất bromophenols.

Khi thời gian chiết tăng từ 30 lên 90 phút thì hàm lượng bromophenols tổng số tăng mạnh. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian chiết lên 90 và 150 phút thì hàm lượng bromophenols không tiếp tục tăng, không có sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$) so với thời gian chiết 120 phút. Như vậy, theo kết quả nghiên cứu thời gian chiết thích hợp để thu nhận bromophenols từ rong được xác định là 90 phút. Trong những nghiên cứu trước đây, vì chưa được đánh giá một cách đầy đủ, nên thời gian chiết bromophenols thường kéo dài [8,9]. Điều này, có thể gây lãng phí thời gian và dung môi chiết. (Hình 5)

3.5. Nhận biết một số nhóm chất có trong dịch chiết rong

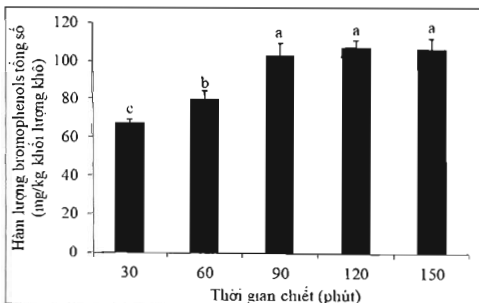
Kết quả định tính một số thành phần phổ biến có trong dịch chiết *Laurencia intermedia* Yamada cho thấy, tất cả các nhóm chất nghiên cứu (alkaloids, phenolics, flavonoids, carotenoids, terpenoids, saponins và tannins) đều có trong dịch chiết rong.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với một số loài rong thuộc chi *Laurencia* thu mẫu tại các vùng biển khác nhau trên thế giới [11,12]. Thành phần các nhóm chất có trong rong biển phụ thuộc vào điều kiện tách chiết và tác động bởi các yếu tố môi trường sống của rong [11]. Sự xuất hiện của các nhóm chất có trong dịch chiết rong *Laurencia intermedia* Yamada đã giải thích cho những hoạt tính sinh học của loài rong này. Tuy nhiên, những nghiên cứu tiếp theo cần định lượng những nhóm chất này.

4. Kết luận

Nghiên cứu hiện tại đã xác định được điều kiện chiết thích hợp để thu nhận bromophenols từ rong đỏ *Laurencia intermedia* Yamada thu hoạch tại vùng biển Khánh Hòa. Những nghiên cứu tiếp theo cần thực hiện để tối ưu hóa điều kiện thu nhận và xây dựng quy trình tinh sạch bromophenols từ loài rong này ■

Hình 5: Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng bromophenols tổng số trong dịch chiết rong *Laurencia intermedia* Yamada. Các chữ cái khác nhau chỉ sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)



Lời cảm ơn:

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài khoa học công nghệ tỉnh Khánh Hòa, mã số: ĐT-2017-20902-DL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Whitfield, F. B., Helidoniotis, F., Shaw, K. J., & Svoronos, D. (1999). Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2367-2373.
2. Thinh, P. D., Menshova, R. V., Ermakova, S. P., Anastuyk, S. D., Ly, B. M., & Zvyagintseva, T. N. (2013). Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mclurei*. *Marine Drugs*, 11(5), 1456-1476.
3. Cuong, H. D., Thuy, T. T., Huong, T. T., Ly, B. M., & Van, T. T. T. (2015). Structure and hypolipidaemic activity of fucoidan extracted from brown seaweed *Sargassum henslowianum*. *Natural Product Research*, 29(5), 411-415.
4. Mikami, D., Kurihara, H., Kim, S. M., & Takahashi, K. (2013). Red algal bromophenols as glucose 6-phosphate dehydrogenase inhibitors. *Marine Drugs*, 11(10), 4050-4057.
5. Zhang, S., Li, Y., You, J., Wang, H., Zheng, Y., & Suo, Y. (2012). Improved method for the extraction and determination of bromophenols in seafoods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10985-10990.
6. Fu, L., Xu, B. T., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xu, X. R., Xia, E. Q., & Li, H. B. (2011). Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2112-2124.
7. Yadav, M., Chatterji, S., Gupta, S. K., & Watal, G. (2014). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 539-542.
8. Xu, X. L., Fan, X., Song, F. H., Zhao, J. L., Han, L. J., Yang, Y. C., & Shu, J. G. (2004). Bromophenols from the brown alga *Leathesia nana*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 6(3), 217-221.
9. Kim, K. Y., Nguyen, T. H., Kurihara, H., & Kim, S. M. (2010). α -glucosidase inhibitory activity of bromophenol purified from the red alga *Polyopes lancifolia*. *Journal of Food Science*, 75(5), H145-H150.
10. Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., & Velić, D. (2011). Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 195-199.
11. Jeyaseelan, E. C., Kothai, S., Kavitha, R., Tharmila, S., & Thavaranjit, A. C. (2012). Antibacterial activity of some selected algae present in the coastal lines of Jaffna peninsula. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(2), 352-356.
12. Omar, H., Al-Judaiband, A., & El-Gendy, A. (2018). Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer Activity and Phytochemical Analysis of the Red Alga, *Laurencia papillosa*. *International Journal of Pharmacology*, 14(4), 572-583.

Ngày nhận bài: 12/10/2019

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 22/10/2019

Ngày chấp nhận đăng bài: 2/11/2019

Thông tin về tác giả:

1. TS. NGUYỄN THẾ HÂN

2. PGS.TS. NGUYỄN VĂN MINH

3. ThS. PHẠM THỊ HIỂN

4. ThS. VŨ LỆ QUYÊN

Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

**DETERMINATION OF SUITABLE
EXTRACTION CONDITIONS FOR EXTRACTING
BROMOPHENOLS FROM RED SEA WEED
LAURENCIA INTERMEDIA YAMADA**

● PHD NGUYEN THE HAN

● Assoc.Prof. PHD NGUYEN VAN MINH

● MSC. PHAM THI HIEN

● MSC. VU LE QUYEN

Faculty of Food Technology - Nha Trang University

ABSTRACT:

Bromophenols are potential bioactive compounds and can be used for prevention and treatment of various diseases. Seaweeds have been demonstrated as rich sources of bromophenols. This study investigated effects of extraction conditions on bromophenols content of red seaweed *Laurencia intermedia* Yamada. The suitable solvent extraction, liquid to solid ratio, extraction temperature and extraction time were found as follows: 75% methanol, 40/1 (ml/g), 80°C and 90 min, respectively. Phytochemical analysis of the seaweed extract showed that phenolics, flavonoids, terpenoids, carotenoids, saponins and tannins are presented.

Keywords: Bromophenols, *Laurencia intermedia* Yamada, extraction conditions, Khanh Hoa provin.