Võ Mai Như Hiếu và cs., 2013, trang 529-535
Kỷ yếu Hội nghị Quốc tế "Biển Đông 2012", Nha Trang, 12-14/9/2012

TINH CHẾ POLYPHENOL TỪ RONG *SARGASSUM MCCLUREI* BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ CỘT

Võ Mai Như Hiếu[1], Bùi Minh Lý[1], Phạm Quốc Long[2], Nguyễn Ngọc Linh[1] và Trần Thị Thanh Vân[1]

[1]Viện nghiên cứu và ứng dụng công nghệ Nha Trang,
[2]Viện hóa học các hợp chất thiên nhiên

Tóm tắt: Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu tinh chế polyphenol từ loài rong *Sargassum mcclurei* bằng phương pháp sắc ký cột. Để chọn chất hấp phụ tốt nhất chúng tôi tiến hành xác định các tính chất hấp phụ của 03 chất hấp phụ: nhựa EXTLITES LS 305, silicagel và PVPP (polyvinylpolypyrrolidone*)*. Kết quả thu được cho thấy trong số 3 chất hấp phụ kể trên thì nhựa hấp phụ EXTLITES LS 305 có khả năng hấp phụ và giải hấp lớn nhất. Các thông số tối ưu với loại nhựa này là nồng độ TPC 9 mg/ml, thể tích hấp phụ 3BV (thể tích nhựa) với tốc độ hấp phụ 3 ml/phút, thể tích giải hấp là 3BV với tốc độ 3 ml/phút. Dịch chiết ethanol sau khi xử lý bằng sắc kí cột có hàm lượng polyphenol tăng gấp 2,4 lần từ 25% đến 60% với hiệu suất là 79,1%.

Từ khóa: *EXTLITES LS 305, Phân lập, Polyphenol, PVPP, Sargassum mcclurei, Silicagel.*

SEPARATION OF TOTAL POLYPHENOL FROM *SARGASSUM MCCLUREI* BY COLUMN CHROMATOGRAPHY

Vo Mai Nhu Hieu[1,*], Bui Minh Ly[1], Pham Quoc Long[2], Nguyen Ngoc Linh[1] and Tran Thi Thanh Van[1].

[1]Nhatrang Institute of technology research and application, VAST
[2]Institute of Natural products chemistry, VAST
*.E-mail : nhuhieu@nitra.vast.vn

Abstract: In the present study, chromatographic method for separation total polyphenol (TPC) from *Sargassum mcclurei* was investigated. Firstly, the perfomance of adsorption properties for three adsorbents: EXTLITE LS 305A resin, silicagel and PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) were carried out in order to choose the best. It showed that EXTLITE LS 305A resin had the best adsorption and desorption capacity among three absorbents. The result demonstrated that under optimum parameters for adsorption on EXTLITE LS 305A resin were solution TPC concentration 9 mg/ml, processing volume 3 BV, flow rate 3 ml/min; while desorption was elution solution aqueous-ethanol (20:80, V:V) 8 BV, flow rate 3.0 ml/min. The purity after being treated was increased 2.4 fold from 25 % to 60 % with recovery yield 79.1 %.

Key words: *EXTLITES LS 305, Isolation, Polyphenol, PVPP, Sargassum mcclurei, silicagel.*

I. GIỚI THIỆU

Trong vài thập kỷ trở lại đây, người ta quan tâm nghiên cứu đến các hợp chất polyphenol như là chất có hoạt tính sinh học chống lại các loại bệnh tật như chống khối u, chống oxy hóa, chống viêm nhiễm, chống dị ứng, và chống bệnh tiểu đường…(Kunihisa, 2008; Hiader và cs, 2009). Polyphenol từ rong nâu được biết với tên gọi riêng là phlorotannin. Chúng là polyme mà trong phân tử của chúng gồm các monome phloroglucinol (1,3,5 trihydroxibenzene) liên kết với nhau thông qua các liên kết aryl, ether... khác nhau (Sailler và Glombitza, 1990; Nakayama và cs, 1989; Fukuyama và cs, 1990). Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã phát hiện các dịch chiết ethanol từ rong có hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn cao (Trần Thị Thanh Vân và cs, 2011), trong bài báo này chúng tôi tiếp tục nghiên cứu làm sạch các hợp chất polyphenol từ dịch chiết ethanol thô từ rong *Sargassum mcclurei* bằng phương pháp sắc kí cột.

Một trong những phương pháp làm sạch các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học phổ biến nhất là phương pháp sắc ký cột. Tùy vào hợp chất cần làm sạch có tính chất hóa học khác nhau mà lựa chọn các chất hấp phụ khác nhau. Trong bài báo này, chúng tôi khảo sát khả năng hấp phụ và giải hấp các hợp chất polyphenol từ dịch chiết ethanol từ loài rong *Sargassum mcclurei* của 03 loại chất hấp phụ khác nhau. Đó là nhựa hấp phụ EXTLITE LS 305A, silicagel và PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) (Sarker và cs, 2006; Koivikko, 2008). Trên cơ sở đó tìm ra loại nhựa có khả năng làm sạch polyphenol tốt nhất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chuẩn bị chất hấp phụ

Cân 50 g chất hấp phụ đem ngâm rửa với cồn ethanol 95% trong 2 giờ, sau đó rửa bằng dung dịch HCl 4% và tiếp tục rửa bằng dung dịch NaOH 4% và cuối cùng rửa bằng nước trao đổi ion cho đến dung dịch rửa có pH trung tính.

2. Xác định hệ số hấp phụ và giải hấp phụ của 03 chất hấp phụ

Lấy 10 g chất hấp phụ vào bình nón 100 ml dung dịch hấp phụ, sau đó thêm 30 ml dung dịch cồn 20% có chứa 5 mg phloroglucinol và khuấy tại nhiệt độ phòng trong 6 giờ. Lọc và xác định hàm lượng phloroglucinol trong dung dịch (pha lỏng) bằng phương pháp Folin – Ciocalteu. Chất hấp phụ (pha rắn) được rửa bằng nước trao đổi ion và sau đó được rửa giải bằng 30 ml dung dịch cồn 80 % tại nhiệt độ phòng và thời gian là 6 giờ. Lọc và xác định hàm lượng phloroglucinol trong dung dịch giải hấp. Tiến hành tương tự nhưng sử dụng dung dịch hấp phụ và dung dịch rửa giải tại các điều kiện pH khác nhau. Nhựa hấp phụ sau khi xử lý được đưa lên cột hấp phụ (2cm x 50 cm).

3. Nồng độ dung dịch chiết

Lấy 5 ml dung dịch chiết pha loãng thành 30, 45, 60 và 75 ml bằng nước trao đổi ion và cho lên cột hấp phụ với tốc độ 180 ml/giờ sau đó rửa giải bằng 250 ml cồn 80 % với tốc độ rửa giải là 180 ml/giờ. Dung dịch sau khi rửa giải đem xác định nồng độ polyphenol.

4. Tốc độ hấp phụ

Lấy 5 ml dung dịch tại pH =6-7 cho lên cột sắc ký (2 x 50 cm) sau đó hấp phụ với các tốc độ 60, 120, 180, 240 và 300 ml/giờ. Rửa giải với 250 ml cồn 80 % với tốc độ 180 ml/giờ. Dung dịch sau khi rửa giải đem phân tích xác định hàm lượng polyphenol tổng số.

5. Nồng độ ethanol

Lấy 5 ml dung dịch tại pH =6-7 cho lên cột sắc ký (2 X50 cm) sau đó hấp phụ với tốc độ 180 ml/giờ. Rửa giải với 250 ml cồn 20, 40, 60 và 80 % với tốc độ 180 ml/giờ. Dung dịch sau khi rửa giải đem phân tích xác định hàm lượng polyphenol tổng số.

6. Tốc độ rửa giải

Lấy 5 ml dung dịch tại pH =6-7 cho lên cột sắc ký (2 x 50 cm) sau đó hấp phụ với tốc độ 180 ml/giờ. Rửa giải với 250 ml nước trao đổi ion với tốc độ 180 ml/giờ sau đó rửa giải với cồn 80 % với tốc độ 60, 120, 180, 240 và 300 ml/giờ. Dung dịch sau khi rửa giải đem phân tích xác định hàm lượng polyphenol tổng số.

7. Thể tích rửa giải

Lấy 5 ml dung dịch tại pH =6-7 cho lên cột sắc ký (2 x 50 cm) sau đó hấp thụ với tốc độ 180 ml/giờ. Rửa giải với 250 ml nước trao đổi ion với tốc độ 180 ml/giờ sau đó rửa giải với 750 ml cồn 80 % cho đến khi không phát hiện có polyphenol trong dung dịch rửa giải. Dung dịch sau khi rửa giải đem phân tích xác định hàm lượng polyphenol tổng số.

8. Dung dịch chiết polyphenol

Lấy 100 g rong *S.mcclurei* đem chiết với 1,5 lít cồn 85 % tại nhiệt độ 40^0C trong 90 phút, tiến hành chiết 03 lần. Dung dịch chiết đem lọc và lấy dung dịch đem cô tại nhiệt độ 40^0C dưới áp suất chân không thu được 100 ml dịch chiết thô. Loại chất màu và lipit bằng chiết clorofooc và sau đó chiết polyphenol bằng ethylacetate. Dịch chiết ethylacetate đem cô cạn dưới áp suất chân không và hòa tan bằng 100 ml nước cất. Dịch chiết polyphenol có nồng độ 5 mg/ml với nồng độ 25 % tính theo chất khô.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Hệ số hấp phụ và giải hấp phụ của 03 chất hấp phụ

Để tìm điều kiện hấp phụ và giải hấp phụ cao nhất của 03 chất hấp phụ là silicagel, nhựa hấp phụ EXTLITE LS 305A và PVPP, chúng tôi tiến hành xác định hệ số hấp phụ và giải hấp phụ của chúng tại các điều kiện khác nhau như sau:

- Dung dịch hấp phụ: Dung dịch cồn 20 % với các pH khác nhau và chứa 9 mg polyphenol/ml.

- Dung dịch giải hấp phụ: Dung dịch cồn 80 % tại pH khác nhau

Kết quả thu được trình bày trong Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH lên khả năng hấp phụ polyphenol trên các chất hấp phụ khác nhau

pH	Nhựa hấp phụ		
	EXTLITE LS 305A	**Silicagel**	**PVPP**
	Tỷ lệ HP	**Tỷ lệ HP**	**Tỷ lệ HP**
2	71,05	55,85	30,04
3	71,05	55,85	30,04
6	83,8	69,78	23,38
7	83,8	69,78	23,38
8	69,05	52,38	26,25
9	69,05	52,38	26,25

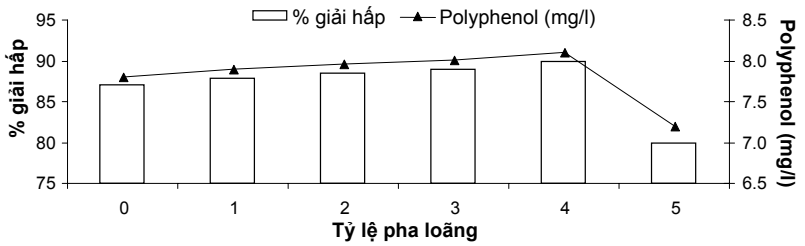
Bảng 2. Ảnh hưởng của pH dung dịch giải hấp phụ lên khả năng giải hấp polyphenol trên các chất hấp phụ khác nhau.

pH	Nhựa hấp phụ		
	EXTLITE LS 305A	**Silicagel**	**PVPP**
	Tỷ lệ GH	**Tỷ lệ GH**	**Tỷ lệ GH**
2	38,3	45,76	58,55
3	38,3	45,76	58,55
6	83,8	69,78	67,27
7	83,8	69,78	67,27
8	87,39	80,1	71,66
9	87,39	80,1	71,66

Số liệu Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy rằng khả năng hấp phụ và giải hấp của các chất hấp phụ phụ thuộc vào pH. Với chất nhựa hấp phụ EXTLITE LS 305A và silicagel thì hệ số hấp thụ đạt giá trị cao nhất tại pH trung tính (6-7) trong khi đó sử dụng PVPP hệ số hấp thụ cao nhất là tại pH =2-3. Trong cùng điều kiện pH, khả năng hấp phụ giảm theo thứ tự sau: Nhựa EXTLITE LS 305A > Silicagel> PVPP. Dựa vào kết quả trên chúng tôi lựa chọn nhựa EXTLITE LS 305A làm chất hấp phụ vì chúng có khả năng hấp thụ cao và hơn nữa giá mua nhựa này rẻ hơn PVPP và silicagel rất nhiều để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

2. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch chiết lên khả năng giải hấp polyphenol trên nhựa hấp phụ *EXTLITE LS 305A*

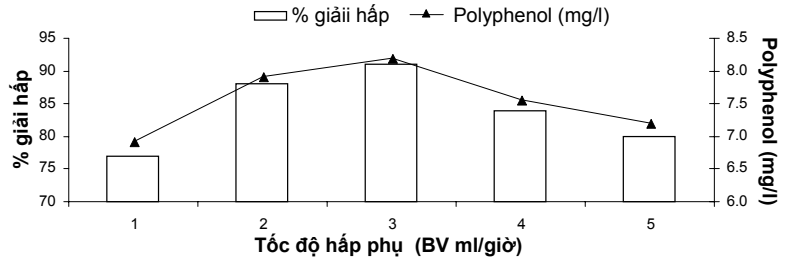
Hình 1 cho thấy khi tăng độ pha loãng từ 0 đến 4 lần thì % giải hấp tăng không đáng kể từ 87 % đến 90 % sau đó giảm khi tiếp tục pha loãng đến 5 lần. Như vậy có thể chọn tỷ lệ pha loãng thích hợp là từ 0 đến 4 lần. Trong nghiên cứu này chúng tôi chọn dung dịch polyphenol ban đầu không pha loãng vì tại tỷ lệ này khả năng giải hấp cao và thể tích dung dịch ít nên thời gian hấp phụ nhanh.



Hình 1.Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch chiết lên khả năng giải hấp polyphenol trên nhựa hấp phụ EXTLITE LS 305A.

3. Ảnh hưởng của tốc độ hấp phụ lên khả năng giải hấp polyphenol trên nhựa hấp phụ *EXTLITE LS 305A*

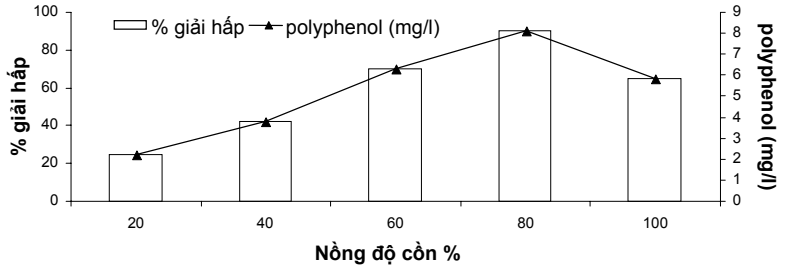
Từ Hình 2 chúng tôi nhận thấy rằng khi tăng tốc độ hấp thụ từ 1 BV đến 3 BV thì mức độ giải hấp tăng từ 77% đến 91 % sau đó giảm khi tăng tốc độ lên 5 BV. Vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi chọn tốc độ hấp phụ là 3 BV tương ứng với thể tích là 180 ml.



Hình 2. Ảnh hưởng của tốc độ hấp phụ lên khả năng giải hấp polyphenol trên nhựa hấp phụ *EXTLITE LS 305A*

4. Ảnh hưởng của nồng độ cồn ethanol lên khả năng giải hấp polyphenol trên nhựa hấp phụ *EXTLITE LS 305A*

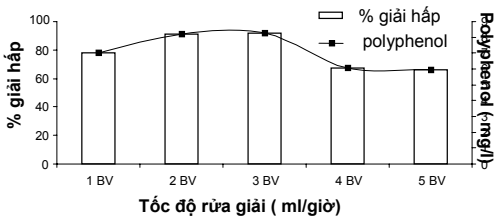
Khi hấp thụ với tốc độ 180 ml/giờ thì từ hình 4 cho thấy độ giải hấp đạt cao nhất tương ứng với nồng độ cồn ethanol 80 %. Điều này có thể do phần lớn polyphenol tan tốt trong dung môi này.



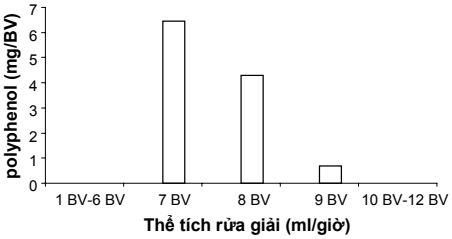
Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ cồn ethanol lên khả năng giải hấp polyphenol trên nhựa hấp phụ *EXTLITE LS 305A*

5. Ảnh hưởng của tốc độ rửa giải và thể tích rửa giải lên khả năng giải hấp polyphenol trên nhựa hấp phụ *EXTLITE LS 305A*

Sau khi hấp thụ 5 ml dịch chiết polyphenol có chứa 45 mg polyphenol tại điều kiện pH từ 6 đến 7, nồng độ cồn ethanol 80 %, tốc độ hấp thụ 180 ml/giờ, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng tốc độ rửa giải lên khả năng hấp thụ và ảnh hưởng của thể tích rửa giải lên hàm lượng polyphenol. Kết quả được trình bày trên hình 5 và hình 6 cho thấy tốc độ rửa giải tốt nhất là 3BV tương ứng độ giải hấp lên tới 92 % và tại tốc độ này hàm lượng polyphenol bằng không cho đến thể tích rửa giải là 6BV. Polyphenol thu được từ thể tích rửa giải 7BV đến 10BV đem cô và xác định hàm lượng polyphenol là 12mg tương ứng với 60 % (tính theo chất khô).



Hình 4. Ảnh hưởng của tốc độ rửa giải lên khả năng giải hấp polyphenol trên nhựa hấp phụ *EXTLITE LS 305A*



Hình 5. Ảnh hưởng của thể tích rửa giải lên khả năng giải hấp polyphenol trên nhựa hấp phụ *EXTLITE LS 305A*

IV. KẾT LUẬN

Polyphenol chiết bằng ethanol từ rong *S.mcclurei* có thể làm sạch bằng phương pháp sắc ký cột khi sử dụng chất hấp phụ là nhựa hấp phụ *EXTLITE LS 305A*. Tại điều kiện hấp phụ là pH= 6-7, nồng độ polyphenol là 9 mg/ml, nồng độ chất khô là 36 mg/ml trong 20 % cồn ethanol, tốc độ hấp thụ 3 BV và điều kiện giải hấp là cồn 80 %, tốc độ rửa giải là 3BV, thu polyphenol từ 7BV đến 9BV. Kết quả thu được polyphenol có độ sạch tăng lên 2,4 lần tương ứng là 60 % với hiệu suất là 79,1 %.

Lời cảm ơn: Tập thể tác giả xin cảm ơn chương trình nghiên cứu cơ bản định hướng ứng dụng – Bộ KH&CN (Hợp đồng số: 06/2010/HĐ-NCCBUD) đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện bài báo này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fukuyama, Y., M. Kodama, I Miura, Z. KinZyo, H. Mori, Y. Nakayama. 1990. Anti-plasmin inhibitor. VI. Structure of phlorofucofuroeckol A, a novel phlorotannin with both dibenzo-1,4-dioxin and dibenzofuran elements, from *Ecklonia kurome* OKAMURA. *Chemical and pharmaceutical Bulletin* 38, 133–5.
2. Hiader, S., Z.X., Li, H. Lin, K. Jamil, and Y.C. Guo. J. 2007. Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds, *Zhejiang Univ. Sci. B*, 10 (2): 147-153.

3. Koivikko R. 2008. Brown algal phlorotannins improving and applying chemical methods, Department of Chemistry University of Turku Finland, Painosalama Oy – Turku, Finland, ISBN 978-951-29-3502-4,13-14pp.
4. Kunihisa I. 2008. Antidiabetic and Antioxidant effects of Polyphenols in Brown Alga Ecklonia stolonifera in Genetically. Diabetic KK-Ay Mice. *Plant Foods Hum Nutr* 63:163–169.
5. Nakayama, Y., M. Takahashi, Y. Fukuyama and Z KinZyo. 1989. An anti-plasmin inhibitor, eckol, isolated from the brown alga Ecklonia kurome OKAMURA. *Agricultural and Biological Chemistry* 63, 3025–30.
6. Sarker S.D., Z. Latif, A.I. Gray 2006. Isolation of Natural Products by Low-Pressure Column Chromatography. In: Natural Products Isolation, Humana Press, Totowa, New Jersey, ISSN 0082-7002,120-129pp.
7. Sailler B., K.W. Glombitza. 1990. Phlorethols and fucophlorethols from the brown alga Cystophora retroflexa, *Phytochemistry* 49 75-770.
8. Trần Thị Thanh Vân, Võ Mai Như Hiếu, Trần Nguyễn Hà Vy, Bùi Minh Lý. 2011. Hoạt tính chống oxy hóa của rong biển miền Trung Việt Nam. *Tuyển tập Hội nghị biển đông lần thứ V- Quyển 4: Sinh học và nguồn lợi sinh vật biển*, NXB. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, 692-698.