

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đỗ Phương Thanh

**PHÂN TÍCH ĐẶC TRƯNG CẤU TRÚC CỦA GLYCOSAMINOGLYCAN
ĐƯỢC CHIẾT TÁCH TỪ HẢI SÂM *HOLOTHURIA LEUCOSPILOTA*
(Brandt, 1835)**

Chuyên ngành : Hóa phân tích

Mã số : 8440118

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH

HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Phạm Đức Thịnh

Nha Trang - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi, được hướng dẫn bởi **TS. Phạm Đức Thịnh** và dựa trên những tài liệu tham khảo do tôi tự tìm hiểu. Các kết quả trình bày trong luận văn là hoàn toàn trung thực với những gì tôi nghiên cứu được và cũng chưa từng được công bố trong bất cứ một nghiên cứu nào trước đây. Nếu sai sự thật, tôi xin chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Nha Trang, tháng 6 năm 2023

Tác giả

Đỗ Phương Thanh

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin có đôi lời cảm ơn đối với Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang đã tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp tôi hoàn thành chương trình đào tạo thạc sĩ Hóa phân tích khóa K2021A năm học 2021-2023. Xin cảm ơn đề tài mã số QTRU02.12/21-22 và QTRU01.07/21-22 đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện luận văn này. Đặc biệt, với tình cảm chân thành nhất, tôi xin dành lòng biết ơn sâu sắc đến thầy TS. Phạm Đức Thịnh, người đã trực tiếp hướng dẫn tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn chỉnh báo cáo.

Tôi cũng xin cảm ơn tất cả các thầy cô giáo, các anh chị học viên, anh chị Phòng Hóa Phân tích và Triển khai công nghệ, đã chỉ bảo, giúp đỡ tôi rất nhiều trong thời gian học tập và làm thực nghiệm đề tài ở Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang.

Và cuối cùng, không thể không nhắc đến gia đình, các anh chị đồng nghiệp đã luôn bên cạnh, thấu hiểu, động viên, chia sẻ giúp tôi hoàn thành tốt song song giữa công việc và học tập.

Một lần nữa, tôi xin chân thành cảm ơn!

Học viên

Đỗ Phương Thanh

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI	1
MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU	3
NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	3
CƠ SỞ KHOA HỌC VÀ TÍNH THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI.....	3
<i>Cơ sở khoa học</i>	3
<i>Tính thực tiễn</i>	3
NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA LUẬN VĂN	3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. GIỚI THIỆU VỀ HẢI SÂM	4
1.1.1. Giới thiệu chung về hải sâm	4
1.1.2. Loài hải sâm <i>Holothuria leucospilota</i>	6
1.1.2.1. Hình thái và hình thức sinh sản	6
1.1.2.2. Cơ chế phòng vệ và môi trường sống	7
1.2. PHÂN LOẠI VÀ PHÂN BỐ CỦA HẢI SÂM.....	8
1.2.1. Phân loại hải sâm	8
1.2.2. Sự phân bố hải sâm ở Việt Nam và trên thế giới.....	9
1.3. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA HẢI SÂM	10
1.3.1. Protein và lipit trong hải sâm	11
1.3.2. Thành phần, hàm lượng vitamin và khoáng chất của hải sâm.....	12
1.3.3. Thành phần carbohydrate của hải sâm	13
1.4. CÁC NGHIÊN CỨU VỀ GLYCOSAMINOGLYCAN TỪ HẢI SÂM TRÊN THẾ GIỚI	13
1.4.1. Thành phần và đa dạng cấu trúc của glycosaminoglycan ở hải sâm	14
1.4.1.1 Hợp chất fucan sulfate ở hải sâm.....	14
1.4.1.2 Hợp chất fucosylated chondroitin sulfat ở hải sâm	18

1.4.2. <i>Hoạt tính sinh học và ứng dụng của glycosaminoglycan hải sâm ...</i>	19
1.4.2.1 Khả năng chống tế bào ung thư	20
1.4.2.2 Hỗ trợ điều trị nguy cơ bệnh tiểu đường	20
1.4.2.3 Điều trị tình trạng tăng mỡ máu, bệnh béo phì, gan nhiễm mỡ	21
1.4.2.4. Hoạt tính kháng viêm.....	22
1.4.2.5. Điều trị rối loạn miễn dịch.....	22
1.4.2.6. Khả năng làm tan huyết khối	23
1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU GLYCOSAMINOGLYCAN TỪ HẢI SÂM Ở VIỆT NAM.....	24
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	27
2.1.1. <i>Đối tượng nghiên cứu</i>	27
2.1.2. <i>Dụng cụ , thiết bị, hóa chất</i>	27
2.1.2.1. <i>Dụng cụ</i>	27
2.1.2.2. <i>Thiết bị</i>	27
2.1.2.3. <i>Hóa chất</i>	28
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	28
2.2.1. <i>Phương pháp xử lí và bảo quản mẫu</i>	28
2.2.2. <i>Phương pháp chiết tách và phân lập glycosaminoglycan từ hải sâm</i>	28
2.2.2.1 Phương pháp chiết tách glycosaminoglycan	28
2.2.2.2. Phương pháp tách phân đoạn tinh sạch glycosaminoglycan hải sâm	30
2.2.3. <i>Các phương pháp phân tích thành phần hóa học của glycosaminoglycan</i>	31
2.2.3.1. Xác định hàm lượng sulfate	31
2.2.3.2. Xác định hàm lượng tổng carbohydrate	32

2.2.3.3. Xác định thành phần đường đơn của glycosaminoglycan	32
2.2.3.4. Phương pháp xác định hàm lượng protein	32
2.2.3.5. Phương pháp xác định hàm lượng uronic acid	33
2.2.4. Xác định khối lượng phân tử trung bình của glycosaminoglycan....	33
2.2.5. Xác định đặc điểm cấu trúc của glycosaminoglycan sử dụng các phương pháp phổ gồm: phổ hồng ngoại (IR) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$)	33
2.2.5.1. Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR.....	33
2.2.5.2. Phương pháp phổ hồng ngoại IR	34
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	36
3.1. KẾT QUẢ CHIẾT TÁCH VÀ THU NHẬN GLYCOSAMINOGLYCAN TỪ HẢI SÂM <i>HOLOTHURIA LEUCOSPILOTA</i>	36
3.2. KẾT QUẢ TÁCH PHÂN ĐOẠN GLYCOSAMINOGLYCAN	37
3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÁC PHÂN ĐOẠN GLYCOSAMINOGLYCAN	41
3.4. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH TRỌNG LƯỢNG PHÂN TỬ CỦA GLYCOSAMINOGLYCAN	46
3.4.1 Phương trình đường chuẩn dextran.....	46
3.4.2 Trọng lượng phân tử GAGs thô	47
3.4.3. Khối lượng phân tử trung bình của phân đoạn F1-GAGs.....	48
3.4.4. Khối lượng phân tử trung bình của phân đoạn F2-GAGs.....	49
3.4.5 Khối lượng phân tử trung bình của phân đoạn F3-GAGs.....	50
3.5. XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC CỦA GLYCOSAMINOGLYCAN TỪ HẢI SÂM <i>H. LEUCOSPILOTA</i>	51
3.5.1. Phổ hồng ngoại IR	51
3.5.1.1 Phổ hồng ngoại IR phân đoạn F1.....	52
3.5.1.2 Phổ hồng ngoại IR phân đoạn F2.....	54
3.5.1.3 Phổ hồng ngoại IR phân đoạn F3.....	56
3.5.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$	57

3.5.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR.....	61
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	64
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	65
PHỤ LỤC.....	76

DANH MỤC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
GLC	Gas Liquid Chromatography	Sắc ký khí, pha tĩnh lỏng
GPC	Gel permeation chromatography	Sắc ký lọc gel
HPLC	High Performance Liquid	Sắc ký lỏng cao áp
¹³ C-NMR	Carbon-13 NMR Spectroscopy	Phổ CHTHN carbon 13
¹ H-NMR	Proton NMR Spectroscopy	Phổ CHTHN proton
IR	Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân (CHTHN)
Fuc	Fucose	Đường fucose
Gal	Galactose	Đường galactose
Gluc	Glucose	Đường glucose
GalNAC	N-Acetyl galactosamine	Đường N-Acetyl galactosamine
GlcA	Glucuronic acid	Đường Glucuronic axit
GAGs	Glycosaminoglycans	Glycosaminoglycans
FCS	Fucosylated chondroitin sulfate	Fucosylated chondroitin sulfate
FS	Fucan sulfate	Fucan sulfate
EtOH	Ethanol	Cồn
TCA	Triclorua acetic acid	Axit Triclorua acetic

TFA	Triflorua acetic acid	Axit Triflorua acetic
Cetavlon	Hexadecyl trimethyl lammonium bromide	Hexadecyl trimethyl lammonium bromide
DEAE - Macro prep	Diethylaminoethyl - Macro prep	
TNF- α	Tumor necrosis factor α	Yếu tố hoại tử khối u α
MUFA	Monounsaturated fats	Chất béo đơn không bão hòa
PUFA	Polyunsaturated fatty acids	Chất béo không bão hòa đa
SFA	Saturated fatty acid	Chất béo bão hòa

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Thông số hình thái một vài loài hải sâm [24].....	9
Bảng 1.2. Hàm lượng các chất dinh dưỡng của hải sâm được tìm thấy ở vùng biển Sabu Raijua (%bb)[30].....	10
Bảng 2.1. Các đỉnh phổ, vùng phổ đặc trưng của fucoidan xuất hiện trên phổ hồng ngoại (IR) [83] [84].....	34
Bảng 3.1. Hàm lượng GAGs được chiết tách từ <i>H. leucospilota</i> và một số loài hải sâm trên thế giới [36,85,86,87,88].	36
Bảng 3.2. Thành phần hóa học của GAGs và các phân đoạn từ hải sâm <i>Holothuria leucospilota</i>	41
Bảng 3.3. Kết quả xác định trọng lượng phân tử GAGs thô.	47
Bảng 3.4. Kết quả xác định khối lượng phân tử phân đoạn F1-GAGs	48
Bảng 3.5. Kết quả xác định khối lượng phân tử phân đoạn F2-GAGs	49
Bảng 3.6. Kết quả xác định khối lượng phân tử trung bình F3-GAGs	50
Bảng 3.7. Các peak đặc trưng phổ IR phân đoạn F1.....	52
Bảng 3.8. Các peak đặc trưng phổ IR phân đoạn F2.....	54
Bảng 3.9. Các peak đặc trưng phổ IR phân đoạn F3.....	56

DANH MỤC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Cấu tạo chung của hải sâm.....	4
Hình 1.2. Hải sâm <i>Holothuria leucospilota</i>	6
Hình 1.3. Hình ảnh các loài hải sâm <i>Actinopyga mauritiana</i> (A), <i>Holothuria scarba</i> (B), <i>Bohadschia marmorata</i> (C) and <i>Holothuria leucospilota</i> (D) [24].	8
Hình 1.4. Phân bố hải sâm <i>Holothuria leucospilota</i> trên thế giới [27].....	9
Hình 1.5. Thành phần amino axit có trong 7 loài hải sâm ở đảo Nam Du....	11
Hình 1.6. Mô hình của Fankter về fucoidan.	14
Hình 1.7. Cấu trúc, phân tử khối và hàm lượng sulfate ở 5 loài hải sâm khác nhau [47][48]. Kết quả trong hình thể hiện sự khác nhau về phân tử khối, hàm lượng sulfate, vị trí sulfate, vị trí liên kết các đường đơn và cả khối lượng phân tử.....	16
Hình 1.8. Cấu trúc oligosacarit từ hải sâm <i>Holothuria floridana</i>	17
Hình 1.9. Cấu trúc fucan sunfate của <i>Holothuria albiventer</i>	17
Hình 1.10. Mô tả hai nhóm FCS ở hải sâm [53].....	18
Hình 1.11. Cấu trúc tổng quát FCS ở các loài hải sâm [55].....	19
Hình 2. 1. Sơ đồ quy trình chiết tách GAGs từ hải sâm <i>H. leucospilota</i>	29
Hình 2. 2. Phân đoạn tinh chế GAGs bằng sắc ký trao đổi anion trên nhựa DEAE Macro-prep.	30
Hình 3. 1. Phân đoạn GAGs bằng sắc ký trao đổi anion.	39
Hình 3.2. Thành phần đường đơn của GAG thô từ hải sâm <i>H. leucospilota</i> trên máy phân tích HPLC ICS-6000.	44
Hình 3. 3. Đồ thị đường chuẩn Dextran.....	46
Hình 3. 4. Sắc ký đồ GPC của GAGs được phân lập từ <i>H. leucospilota</i>	47
Hình 3. 5. Sắc ký đồ GPC của phân đoạn F1-GAGs từ <i>H. leucospilota</i>	48
Hình 3. 6. Sắc ký đồ GPC của phân đoạn F2-GAGs từ <i>H. leucospilota</i>	49
Hình 3.7. Sắc ký đồ GPC của phân đoạn F3-GAGs từ <i>H. leucospilota</i>	50

Hình 3.8. Phổ hồng ngoại phân đoạn F1	52
Hình 3.9. Phổ hồng ngoại phân đoạn F2	54
Hình 3.10. Phổ hồng ngoại phân đoạn F3	56
Hình 3.11. Phổ cộng hưởng từ ^1H -NMR phân đoạn F1	58
Hình 3.12. Phổ cộng hưởng từ ^1H -NMR phân đoạn F2	59
Hình 3.13. Phổ cộng hưởng từ ^1H -NMR phân đoạn F3	59
Hình 3.14. Phổ ^{13}C -NMR của phân đoạn F2	62

MỞ ĐẦU

LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Thế kỉ 21 được xem là kỉ nguyên của ngành công nghệ sinh học. Nhiều nước tiên tiến trên thế giới đang dồn rất nhiều tài nguyên nhằm phát triển công nghệ, tìm kiếm các hợp chất mới với mục đích chăm sóc sức khỏe con người, cũng như những tham vọng lớn trong lĩnh vực nghiên cứu gen, dược phẩm. Y tế, sức khỏe cộng đồng luôn là lĩnh vực được quan tâm hàng đầu, nhất là trong bối cảnh tỉ lệ mắc các bệnh ung thư, béo phì, tim mạch ngày càng cao do chế độ sinh hoạt không lành mạnh hoặc sử dụng nhiều thực phẩm chế biến công nghiệp với đầy rẫy chất phụ gia, bảo quản. Các dược phẩm, thực phẩm chức năng ngày một phổ biến và được nghiên cứu nhiều hơn nhờ sự phát triển của khoa học kĩ thuật. Các hoạt chất có nguồn gốc tự nhiên đang được chú ý khai thác bởi những lợi ích nâng cao sức khỏe hay khả năng chữa bệnh với hoạt tính sinh học tuyệt vời của chúng. Đặc biệt việc sử dụng các hoạt chất tự nhiên được cho là biện pháp lâu dài và tối ưu hơn, giảm thiểu nguy cơ tác dụng phụ của các loại hóa dược. Đó cũng chính là lí do các nhà khoa học đã và đang quan tâm nhiều hơn đến các chất chiết xuất có nguồn gốc tự nhiên từ động thực vật và đặc biệt là từ các loài cá, nhuyễn thể sinh sống trong môi trường nước, bởi sự dồi dào của nguồn tài nguyên này.

GAGs, có tên đầy đủ là Glycosaminoglycans, chính là một trong số đó, một hợp chất tự nhiên vô cùng quý giá được phân lập từ tảo nâu và động vật biển không xương sống. Glycosaminoglycans là hợp chất glycan sulfate hóa với thành phần cấu tạo chính bởi nhóm các hexosamine, uronic acid hoặc galactose. GAGs được phân thành nhiều nhóm như chondroitin sulfate, heparin, heparan sulfate, dermatan sulfate và keratan sulfaten với mỗi nhóm mặc dù có cấu trúc tương đồng nhưng thành phần cấu tạo thì khác nhau. Những polysaccharide sulfate này được biết đến bởi hoạt tính sinh học đa dạng, có giá trị chữa bệnh cao như tác dụng làm tan máu đông, chống tạo mạch, kháng u, kháng viêm, chữa huyết áp cao, chống oxi hóa, kháng virus... [1][2]. Điều này làm cho việc nghiên cứu hoạt chất trên ngày càng phổ biến nhằm khám phá và tận dụng các lợi ích sinh học to lớn của chúng. Trong đó phải kể đến những nghiên cứu về GAGs phân lập từ hải sản, một sinh vật biển đa dạng về loài, phân bố rộng khắp các vùng biển trên thế giới. Các nghiên cứu chỉ ra có hai

nhóm chủ yếu, riêng biệt của GAGs phân lập từ hải sâm bao gồm: fucan sulfate (FS) và fucosylated chondroitin sulfate (FCS). Hai nhóm này ở hải sâm có các đặc điểm đặc biệt hơn những GAGs được phân lập từ động thực vật khác.

FS ở hải sâm là polyme mạch thẳng bao gồm các gốc fucose và/hoặc fucose (sulfate). Cấu trúc tuyến tính làm cho việc nghiên cứu sẽ dễ tiếp cận hơn so với FS có cấu trúc phức tạp khi phân lập từ tảo nâu. FS từ các loại hải sâm khác nhau sẽ chủ yếu khác nhau về vị trí thế và hàm lượng các nhóm sulfate trong gốc fucose [1]. FCS là polyme phân nhánh có cấu trúc bao gồm các đơn vị disaccharide lặp lại β -D-GalNAc và β -D-Gluc. Cấu trúc mạch FCS ở hải sâm cũng tương tự như chondroitin có nguồn gốc từ động vật có vú nhưng đặc biệt hơn bởi cấu trúc phân nhánh chủ yếu ở vị trí C-3 của gốc glucuronic acid [3]. FCS của các loài hải sâm khác nhau cũng sẽ khác nhau về cấu trúc mạch nhánh (số lượng, cách phân nhánh) và mức độ sulfate trong mạch chính [4].

Có nhiều nghiên cứu về GAGs ở hải sâm trên thế giới và những nghiên cứu này đã chỉ ra sự khác biệt đáng kể về đặc tính sinh học của các hợp chất GAGs từ những loài hải sâm khác nhau. Sự khác biệt này dựa trên sự khác nhau về cấu trúc của các GAGs. Do đó giá trị khai thác và sử dụng cũng sẽ khác nhau đáng kể. Vậy nên việc phân lập và làm rõ đặc điểm cấu trúc của GAGs từ các loài hải sâm là quan trọng, mang tính định hướng khoa học nhằm tìm kiếm, phát triển các loại dược phẩm, thực phẩm giúp nâng cao sức khỏe từ nguồn tài nguyên biển dồi dào này.

Holothuria leucospilota là một trong những loài hải sâm có phân bố tự nhiên ở nhiều vùng biển phía Bắc Việt Nam. Nhưng đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào công bố về hợp chất glycosaminoglycan từ loài hải sâm này tại Việt Nam. Do đó, việc thực hiện đề tài **“Phân tích đặc trưng cấu trúc của glycosaminoglycan được chiết tách từ hải sâm *Holothuria leucospilota* (Brandt, 1835)”** là cần thiết, có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn. Kết quả nghiên cứu trong đề tài này sẽ góp phần cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo, cũng như tạo tiền đề cho việc khai thác và phát triển bền vững nguồn tài nguyên sinh vật biển nói chung, nguồn hải sâm ở nước ta nói riêng.

MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU

Chiết tách và phân tích một số đặc trưng cấu trúc của glycosaminoglycan từ hải sâm *Holothuria leucospilota*.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Chiết tách, thu nhận glycosaminoglycan từ hải sâm *Holothuria leucospilota*.
- Tinh chế phân đoạn glycosaminoglycan bằng phương pháp sắc ký.
- Xác định tỉ lệ thành phần hóa học của các phân đoạn glycosaminoglycan từ *Holothuria leucospilota* (carbohydrate tổng, tỉ lệ sulfate, tỉ lệ acid uronic, tỉ lệ protein).
- Xác định một số đặc điểm cấu trúc các phân đoạn glycosaminoglycan từ loài hải sâm *Holothuria leucospilota*.

CƠ SỞ KHOA HỌC VÀ TÍNH THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

Cơ sở khoa học

Kết quả nghiên cứu từ đề tài sẽ là số liệu khoa học mới về thành phần hóa học và đặc trưng cấu trúc của *glycosaminoglycan* được phân lập từ loài hải sâm *Holothuria leucospilota* ở vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa. Góp phần làm phong phú công trình nghiên cứu chung về hải sâm.

Tính thực tiễn

Kết quả nghiên cứu từ đề tài sẽ tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo. Từ đó giúp mở rộng hướng đi trong việc tìm kiếm, khai thác và sử dụng các hoạt chất sinh học từ nguồn sinh vật biển nói chung và hải sâm nói riêng. Không những tăng cường sức khỏe xã hội, mà còn nâng cao giá trị sử dụng của hải sâm. Cho ta cái nhìn tổng thể về hướng khai thác, bảo tồn, phát triển nguồn tài nguyên biển.

NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA LUẬN VĂN

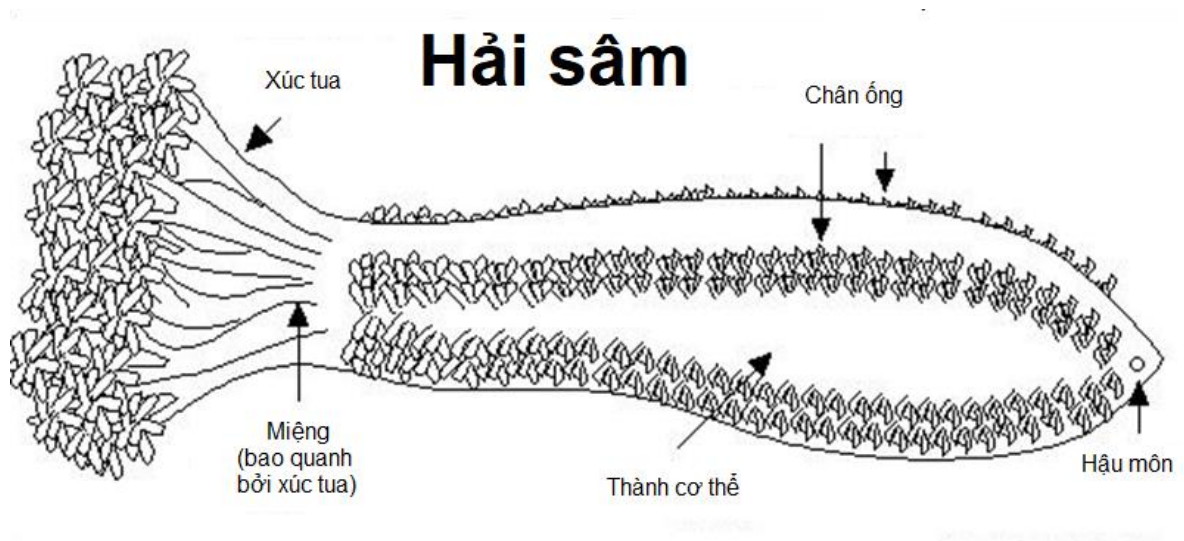
Luận văn chỉ ra hàm lượng glycosaminoglycan được chiết tách từ hải sâm *H. leucospilota* qua đó làm sáng tỏ một vài đặc trưng cấu trúc của hợp chất trên từ loài hải sâm này; góp phần bổ sung số liệu khoa học cho những nghiên cứu tiếp theo về hải sâm ở Việt Nam và trên thế giới.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ HẢI SÂM

1.1.1. Giới thiệu chung về hải sâm

Hải sâm, tên khoa học là "*Cucumis marimus*", một loại động vật không xương sống thuộc ngành Da gai (*Echidermata*), cùng ngành với sao biển, nhím biển, là nguồn thực phẩm quan trọng cho con người, đặc biệt là ở một số vùng của Châu Á [5]. Chúng đã xuất hiện ở các đại dương cách đây 540 triệu năm trong suốt quá trình tiến hóa [6]. Lớp hải sâm rất phong phú, đa dạng về loài, nhiều trong số đó mang lại giá trị dinh dưỡng cao nên cũng được quan tâm khai thác, nuôi trồng và thương mại hóa. Một vài đại diện tiêu biểu có giá trị kinh tế cao phải kể đến như hải sâm vú (*Holothuria nobilis*), hải sâm vú trắng (*Holothuria fuscogilva*), hải sâm cát (*Holothuria scabra*), hải sâm đen (*Holothuria vagabunda*),... Số khác thì đứng trước nguy cơ tuyệt chủng nên đang được bảo tồn, bảo vệ như hải sâm lựu (*Thelenota ananas*), hải sâm dứa (*Actinopyga mauritiana*).



Hình 1.1. Cấu tạo chung của hải sâm

Về cấu tạo, hải sâm là loài xương trong, có cơ thể thon dài giống với cái tên "dưa chuột biển" của nó. Miệng nằm ở mặt bụng- một đặc trưng của loài thủy sinh tầng đáy, quanh miệng có vành tua rõ rệt. Hậu môn nằm cuối thân. Cơ thể có 2-3 hàng gai thịt lớn dạng hình nón khá dài chạy dọc theo hai đường biên ở lưng. Mặt bụng phẳng có 3 dải chân ống hình trụ, nhỏ và dài, cuối chân có đĩa bám [7].

Nguồn thức ăn của hải sâm đến từ các xác chết của động vật, phù du và các vụn hữu cơ dưới biển. Trong quá trình tìm kiếm thức ăn, hải sâm còn làm sạch cát và đá vôi nhỏ bằng cách "lọc" chúng qua đường ruột của mình, theo Crozier (1918) đã ước tính rằng trong 1,7 dặm vuông đáy biển ở Harrington Sound, Bermuda, có khoảng 500-1000 tấn cát được làm sạch bằng cách này hàng năm (coi chiều dài trung bình của hải sâm là 27 cm và trọng lượng khô của cát chứa trong ruột nó là 46 gam) [8]. Hải sâm góp phần ngăn ngừa sự tích tụ chất hữu cơ trong trầm tích biển và có thể giúp kiểm soát tác động của các tác nhân gây bệnh, làm thay đổi thành phần hóa học nước biển một cách tích cực [9]. Lớp Holothuroidea đại diện cho 90% sinh khối đáy biển sâu, do đó các loài của nó được coi là một trong những sinh vật chiếm ưu thế nhất trên thế giới [10] [11]. Hải sâm có đặc tính bắt mồi khá thụ động, do cấu tạo cơ thể không cho phép chúng di chuyển linh hoạt. Chính vì vậy, con mồi của hải sâm là những loài trôi nổi trong sóng biển mắc phải xúc tu của nó, hoặc để kiếm thức ăn, chúng phải di chuyển đến khu vực có nhiều rác hữu cơ như xác chết, thức ăn thừa của quá trình nuôi nhốt thủy sản. Do vậy cũng dễ hiểu khi các quần thể loài này có thể được phát hiện cạnh các trang trại thủy sản của con người [12].

Cơ chế phòng vệ của hải sâm cũng rất đặc biệt tương tự như các loài động vật trong ngành da gai khác. Đó là cơ chế loại bỏ một phần phụ, hoặc một bộ phận cơ thể khi gặp nguy hiểm [13]. Số ít sẽ tiết chất độc qua da khi bị đe dọa.

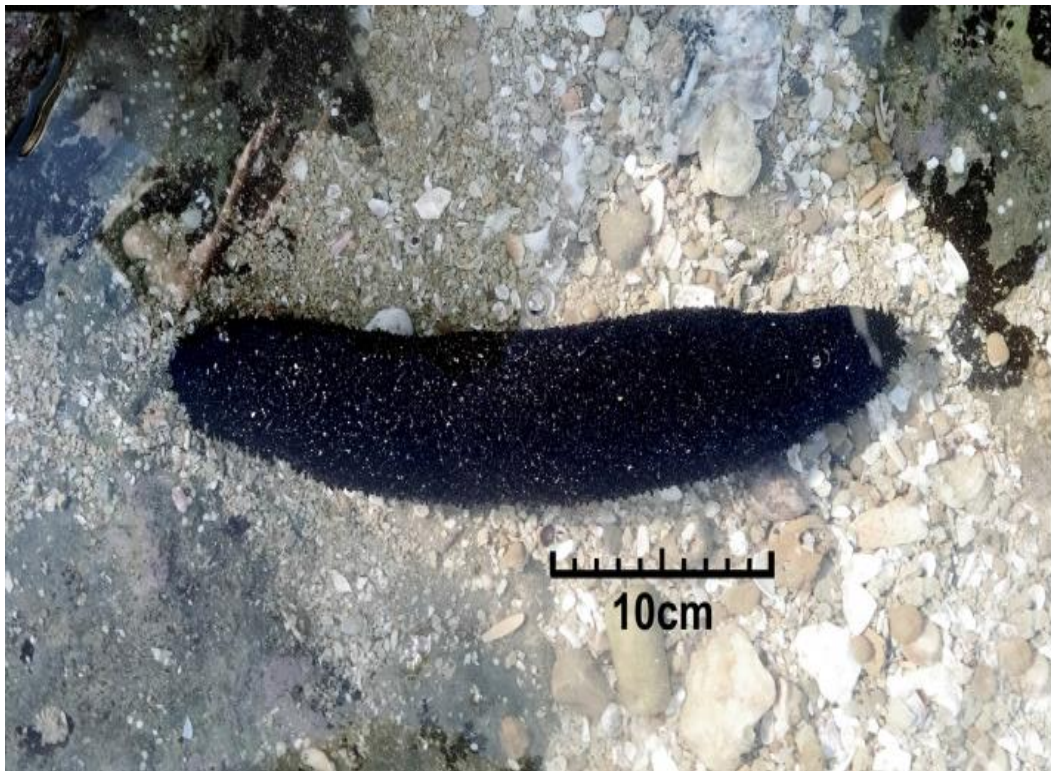
Hải sâm có thể sinh sản vô tính lẫn hữu tính. Tuy nhiên hải sâm chủ yếu là loài phân tính và chúng sẽ sinh sản bằng cách phóng tinh trùng và trứng vào nước biển, trứng thụ tinh và phát triển ngoài cơ thể mẹ. Cũng có một số trường hợp trứng phát triển thành cá thể con ngay trong cơ thể mẹ. Quá trình này phụ thuộc vào thời tiết, các cá thể có thể tạo ra hàng ngàn giao tử trong thời kỳ sinh sản nếu như điều kiện thuận lợi [14].

Ở khu vực Ấn Độ Dương-Thái Bình Dương, hải sâm được tiêu thụ để lấy thành thân khô của chúng chế biến các món ăn tẩm bổ hoặc được sử dụng như một loại thuốc truyền thống để bổ máu, điều trị hen suyễn, tắc nghẽn xoang, huyết áp cao hay các bệnh về khớp. Do đó tạo thành một giá trị thương mại quan trọng trong nghề đánh bắt ven biển. Nhu cầu trên toàn thế giới đối với hải sâm đã làm tăng áp lực đánh bắt nguồn tài nguyên biển này dẫn đến việc khai

thác quá mức [15]. Điều đó khiến một số loài holothurian có nguy cơ tuyệt chủng. Tuy nhiên, các chiến lược thay thế đã được thực hiện như khám phá các ngư trường mới hoặc phát triển nuôi trồng thủy sản bằng cách thả cá thể con được nuôi trong trại giống đã góp phần khôi phục số lượng tự nhiên loài này [16] [17]. Các quốc gia Tây Ấn Độ Dương đã buôn bán hải sâm hàng trăm năm nay, tuy nhiên gần đây các giá trị sinh học, cũng như cách thức sinh sản của chúng mới được quan tâm để quản lý nguồn tài nguyên này.

1.1.2. Loài hải sâm *Holothuria leucospilota*

Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota ban đầu được biết đến với tên gọi là *Stichopus (Gymnochirota) leucospilota*, được mô tả bởi Brandt, J.F. năm 1835 [18]. Do đó sau này chúng được biết đến với tên gọi *Holothuria leucospilota* (Brandt, 1835).



Hình 1.2. Hải sâm *Holothuria leucospilota*

1.1.2.1. Hình thái và hình thức sinh sản

Thông thường *Holothuria leucospilota* có thể dài khoảng 30-40 cm và có thể dài tới 1m. Cơ thể mềm, dài và hình trụ, không nhìn thấy bên dưới hoặc bên trên. Màu sắc đồng đều từ nâu sẫm hoặc nâu hạt dẻ đến đen, có 20 đầu tua lớn rậm rạp dùng để ăn, các xúc tu hướng xuống dưới để thu thập thức ăn thừa

từ mặt đất. Cá thể trưởng thành của loài này có thể đạt trọng lượng tới hơn 700 gam, nhưng chủ yếu dao động ở 300 – 450 gam [19].

H. leucospilota là loài lưỡng tính với chu kỳ sinh sản hàng năm trong đó quá trình sinh sản phát tán khác nhau tùy theo địa sinh học. Mô hình sinh sản của hải sâm nói chung phụ thuộc vào thời gian chiếu sáng của mặt trời và nhiệt độ. *H. leucospilota* có tới hai hình thức sinh sản, vô tính và hữu tính. Chúng thường sinh sản vô tính bằng việc phân đôi ngang cơ thể. Tuy nhiên cũng có thể sinh sản hữu tính bằng việc phát sinh giao tử (thường diễn ra vào ban đêm), quá trình thụ tinh và phát triển ấu trùng diễn ra trong nước [20]. Ấu trùng phù du phát tán, sinh sống ở trong cột nước và có thể sống ngoài khơi trong một thời gian dài. Theo sóng biển, chúng phân tán trên một khoảng cách xa. Nếu ở khu vực sâu và rải rác ở rặng san hô ngoài khơi thì chúng sinh sản hữu tính, còn ở những quần thể lớn và gần bờ hơn thì chúng chủ yếu phân đôi cơ thể.

Quá trình phát triển ở *H. leucospilota* được chia thành năm giai đoạn: cá thể con, chưa trưởng thành, đang phát triển, trưởng thành và sau khi sinh sản [21]. Nhìn chung việc sinh sản này diễn ra đồng bộ vào mùa hè, tức khoảng tháng 7 hàng năm khi bức xạ mặt trời cao, nhiệt độ nước biển ấm lên và lượng mưa đạt cực đại.

1.1.2.2. Cơ chế phòng vệ và môi trường sống

Như đã nêu ở phần trên, cơ chế phòng vệ ở hải sâm nói chung và *H. leucospilota* nói riêng là loại bỏ một phần cơ thể khi gặp nguy hiểm. Ở trường hợp này, bộ phận bị loại bỏ là nội tạng của chúng. Thật vậy, khi bị đe dọa, hải sâm sẽ "nôn" nội tạng ra khỏi cơ thể qua đường hậu môn. Nguyên nhân là bởi chất nhầy có trong đường ruột có chứa chất độc giúp xua đuổi kẻ thù, hoặc sẽ bao lấy kẻ săn mồi làm hạn chế khả năng di chuyển, giúp hải sâm tăng cơ hội thoát thân [13].

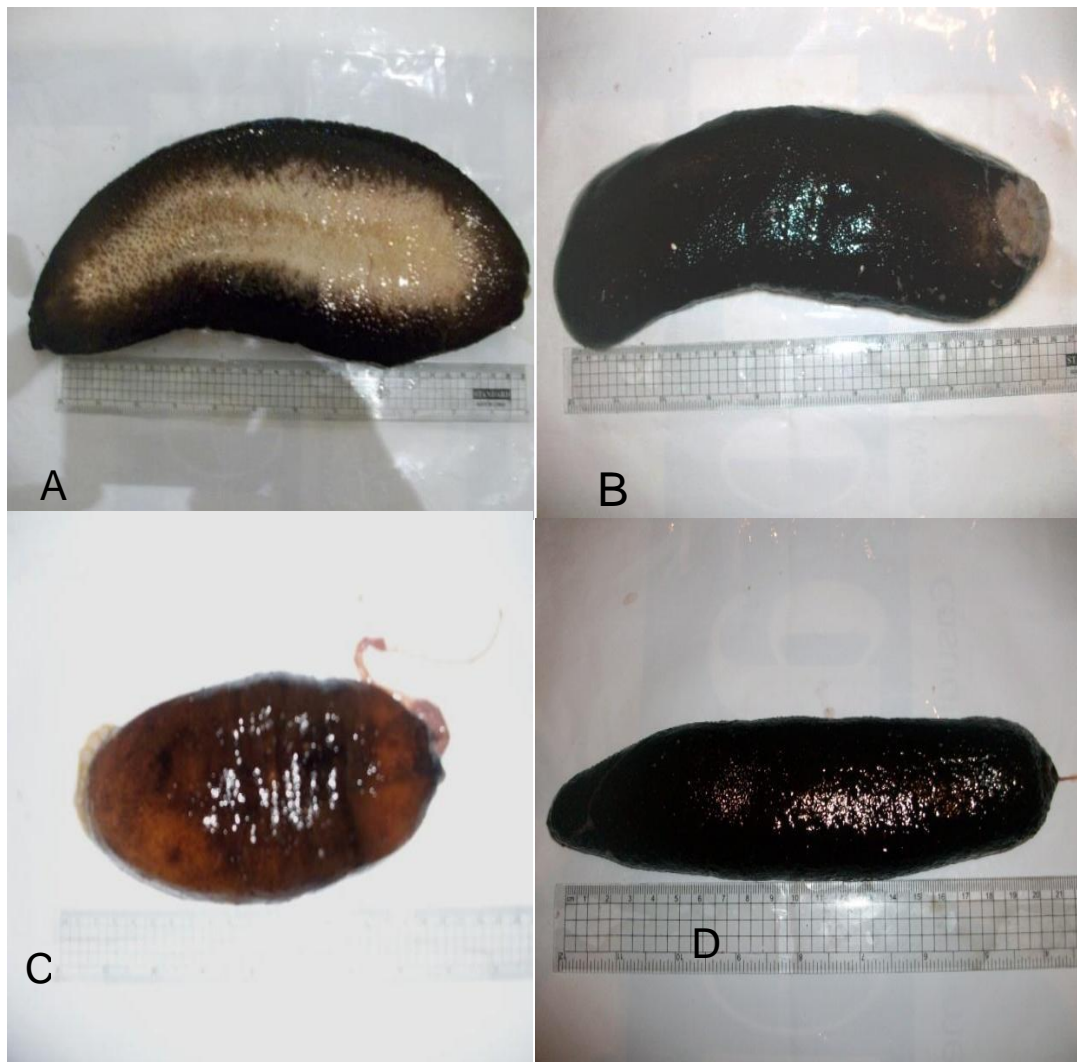
Holothuria leucospilota luôn trần trụi và gần như đen, có vỏ mềm hơn với các nốt sần nhỏ khiến nó có vẻ ngoài gai góc. Chúng rất thích sinh sống ở những khu vực yên tĩnh, hơi sâu dưới đáy cát hoặc trên đá vụn san hô và đóng vai trò như một hệ thống treo, bộ lọc có giá trị đáng kể dưới đáy biển. Khả năng chịu được sự thay đổi về độ mặn và nhiệt độ của loài này khá tốt. Ngoài ra *H.*

leucospilota cũng chịu được việc tiếp xúc với không khí trong thời gian dài (đưa chúng ra khỏi môi trường nước) [22].

1.2. PHÂN LOẠI VÀ PHÂN BỐ CỦA HẢI SÂM

1.2.1. Phân loại hải sâm

Hải sâm rất đa dạng và phong phú khi có tới khoảng 2500 loài thuộc 25 họ và 6 bộ khác nhau thuộc lớp *Holothuroidea*. Để phân biệt chúng, người ta dựa vào sự khác nhau về đặc điểm cấu tạo hình thái hoặc phân tích gen. Sự khác nhau có thể đến từ sự xuất hiện hay vắng mặt chân ống, podia, hình dạng của xúc tu ở miệng, có hay không có cơ co rút miệng, cây hô hấp, ống cuvierian [23].



Hình 1.3. Hình ảnh các loài hải sâm *Actinopyga mauritiana* (A), *Holothuria scarba* (B), *Bohadschia marmorata* (C) and *Holothuria leucospilota* (D) [24]

Bảng 1.1. Thông số hình thái một vài loài hải sâm [24]

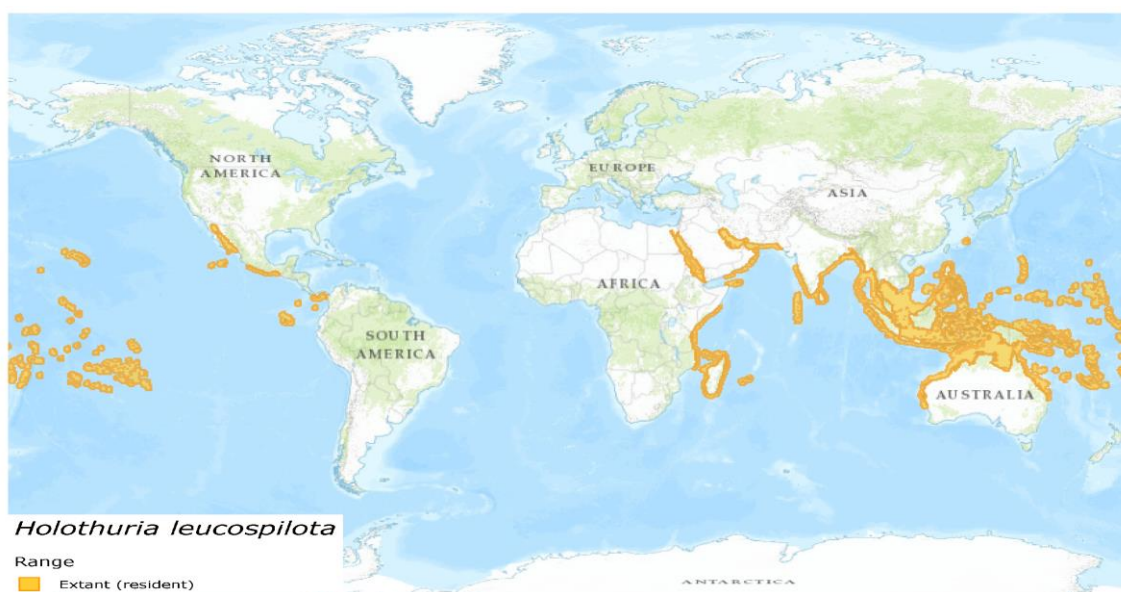
Loài hải sâm	Chiều dài (cm)	Chiều rộng (cm)	Khối lượng (g)	Độ dày (cm)
<i>Actinopyga mauritiana</i>	32	11	600	1
<i>Holothuria scarba</i>	26	7.5	300	0.6
<i>Bohadschia marmorata</i>	18	8.5	300	0.7
<i>Holothuria leucospilota</i>	22	5.5	200	0.5

Riêng ở Việt Nam theo ước tính hiện có khoảng 90 loài hải sâm được biết đến, trong đó các họ *Holothuria*, *Sticopus* và *Colochirus* là phong phú nhất. [25]

1.2.2. Sự phân bố hải sâm ở Việt Nam và trên thế giới

Hải sâm phân bố rộng khắp trên tất cả các đại dương, từ vùng triều cho tới rãnh sâu nhất, ở tất cả các vĩ độ, nhưng chủ yếu môi trường sống chính của chúng là trên các thềm đá cứng, rạn san hô [26].

Ở nước ta hải sâm tập trung nhiều ở vùng biển Thanh Mai-Quảng Ninh, đảo Cát Bà, đảo Bạch Long Vĩ, đảo Cô Tô, đảo Lý Sơn, đảo Phú Quốc, quần đảo Trường Sa, Khánh Hòa.

**Hình 1.4.** Phân bố hải sâm *Holothuria leucospilota* trên thế giới [27]

Loài *Holothuria leucospilota* (Brandt,1835) thuộc chi *Holothuria*, họ *Holothuriidae*, bộ *Holothuriida*, lớp *Holothuroidea*, ngành *Echinodermata*. Đây là một loài cơ hội, phân bố rất rộng rãi và được tìm thấy ở hầu hết các khu vực nhiệt đới của Ấn Độ Dương, phía tây trung tâm Thái Bình Dương, Châu Phi và Châu Á và chúng cũng là loài chiếm ưu thế ở Vịnh Ba Tư [28]. Ở Việt Nam, loài này phân bố nhiều ở đảo Cát Bà, vịnh Hạ Long, đảo Nam Du, và ở Vịnh Nha Trang - Khánh Hòa.

1.3. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA HẢI SÂM

Thành phần của hải sâm bao gồm các protein, chất béo, cacbohydrate. Ngoài ra chúng còn chứa nhiều chất dinh dưỡng quý giá như các khoáng chất canxi, magie, sắt, kẽm,...và các vitamin A, B1, B2, B3,...[29]. Giá trị dinh dưỡng của hải sâm có mối liên hệ mật thiết với các yếu tố như giống loài, điều kiện nước, thức ăn, tập tính, thời điểm thu hoạch,...

Ví dụ về sự khác nhau về hàm lượng dinh dưỡng trong hải sâm có thể thấy trong mô tả ở Bảng 1.2 trích từ nghiên cứu của Oedjoe MDR (2017) dưới đây.

Bảng 1.2. Hàm lượng các chất dinh dưỡng của hải sâm được tìm thấy ở vùng biển Sabu Rajjua (%bb)[30]

Giống loài	Hàm lượng dinh dưỡng				
	Protein	Lipit	Carbohydrate	Tro	Nước
<i>Holothuria nobilis</i>	42,54	1,09	0,56	2,39	76,05
<i>Holothuria scabra</i>	44,07	1,02	0,45	2,01	76,03
<i>Holothuria atra</i>	42,42	1,12	0,87	2,38	78,34
<i>Holothuria edulis</i>	41,61	1,08	1,14	2,47	78,16
<i>Holothuria leucospilota</i>	39,87	1,14	2,12	2,43	79,11

Nhìn chung hải sâm tươi chứa lượng lớn nước trong cơ thể, và có hàm lượng đạm rất cao. Điều này cũng đã được mô tả trong nhiều nghiên cứu khác như Wen và cộng sự (2010) cũng cho biết hàm lượng dinh dưỡng trong hải sâm

tươi bao gồm 5,78% đến 9,53% protein, 0,17% đến 0,37% chất béo, 3,59% đến 11,06% tro và 84,45% đến 87,21% nước [31].

1.3.1. Protein và lipid trong hải sâm

Hải sâm thường được mua bán tiêu thụ dưới dạng khô, thực phẩm bổ sung, viên nang hoặc viên nén. Do đó hàm lượng dinh dưỡng trong hải sâm khô cũng được nghiên cứu rất nhiều. Việc nghiên cứu hàm lượng protein cũng rất quan trọng trong việc xem xét kết cấu, chất lượng thịt. Có thể làm khô mà không mất kết cấu thịt là minh chứng của hàm lượng protein cao trong hải sâm.

Thịt hải sâm có nhiều protein chứa các thể keo chiếm từ 40÷60%, trong đó một số loài có hàm lượng lên đến 77,5% [32]. Protein trong hải sâm chứa nhiều axit amin. Nhiều trong số đó là lysine, arginine và tryptophan, các chất dễ dàng được tiêu hóa và hấp thu bởi cơ thể.

Thành phần amino axit (% khối lượng khô) của 7 loài hải sâm thu được ở đảo Nam Du, tỉnh Kiên Giang

Loài	<i>Holothuria atra</i>	<i>Holothuria leucospilota</i>	<i>Holothuria scabra</i>	<i>Stichopus hermanni</i>	<i>Stichopus horren</i>	<i>Stichopus monotuberculatus</i>	<i>Stichopus variegatus</i>
EAA							
Agrinine	2.37±0.06 ^d	2.13±0.09 ^{cd}	2.25±0.08 ^d	1.34±0.09 ^a	1.79±0.05 ^b	1.90±0.05 ^{bc}	1.86±0.09 ^{bc}
Histidine	0.34±0.03 ^a	0.38±0.04 ^a	0.32±0.04 ^a	0.29±0.03 ^a	0.31±0.03 ^a	0.27±0.02 ^a	0.34±0.03 ^a
Isoleucine	0.61±0.03 ^{bc}	0.43±0.02 ^a	0.81±0.04 ^d	0.62±0.06 ^{bc}	0.59±0.03 ^{ab}	0.63±0.08 ^{bcd}	0.78±0.0 ^{cd}
Leucine	1.09±0.06 ^a	1.44±0.04 ^c	1.39±0.03 ^{bc}	1.13±0.08 ^a	1.18±0.04 ^a	1.24±0.02 ^{ab}	1.21±0.05 ^{ab}
Lysine	0.72±0.03 ^{ab}	1.07±0.06 ^c	0.84±0.04 ^b	0.76±0.05 ^{ab}	0.70±0.03 ^{ab}	0.63±0.04 ^a	0.71±0.03 ^{ab}
Methionine	0.37±0.03 ^a	0.51±0.02 ^b	0.48±0.02 ^{ab}	0.45±0.05 ^{ab}	0.43±0.03 ^{ab}	0.38±0.04 ^a	0.46±0.02 ^{ab}
Phenylalanine	0.65±0.02 ^a	0.88±0.04 ^c	1.05±0.03 ^d	0.77±0.01 ^{bc}	0.84±0.02 ^c	0.71±0.02 ^{ab}	0.66±0.04 ^a
Threonine	0.44±0.08 ^a	0.72±0.03 ^c	0.64±0.04 ^{bc}	0.50±0.03 ^{ab}	0.57±0.04 ^{abc}	0.55±0.03 ^{abc}	0.48±0.03 ^{ab}
Valine	1.11±0.06 ^b	0.89±0.04 ^a	1.12±0.06 ^b	1.02±0.02 ^{ab}	1.09±0.06 ^b	0.96±0.03 ^{ab}	1.03±0.04 ^{ab}
Total EAA	7.65±0.29 ^{ab}	8.39±0.25 ^{bc}	8.94±0.23 ^c	6.91±0.26 ^a	7.47±0.33 ^{ab}	7.29±0.24 ^a	7.44±0.25 ^{ab}
Non-EAA							
Alanine	3.24±0.05 ^d	2.19±0.04 ^b	2.50±0.02 ^c	2.14±0.02 ^b	1.92±0.04 ^a	2.15±0.03 ^b	2.11±0.04 ^b
Aspartic acid	0.89±0.04 ^a	2.66±0.05 ^b	3.10±0.06 ^c	2.68±0.06 ^b	2.51±0.08 ^b	2.57±0.11 ^b	2.45±0.09 ^b
Cystine	1.11±0.08 ^b	0.16±0.04 ^a	0.11±0.02 ^a	0.08±0.01 ^a	0.13±0.02 ^a	0.09±0.01 ^a	0.14±0.02 ^a
Glutamic acid	3.91±0.16 ^c	3.30±0.07 ^{ab}	3.95±0.08 ^c	3.37±0.05 ^{ab}	3.09±0.05 ^a	3.13±0.08 ^a	3.52±0.11 ^b
Glycine	2.37±0.08 ^a	3.85±0.06 ^b	5.21±0.05 ^e	4.18±0.06 ^c	4.01±0.04 ^{bc}	4.20±0.05 ^c	4.41±0.04 ^d
Proline	1.28±0.06 ^a	2.44±0.10 ^c	2.85±0.08 ^d	2.21±0.03 ^{bc}	2.18±0.05 ^b	2.33±0.06 ^{bc}	2.19±0.04 ^b
Serine	2.42±0.05 ^c	1.24±0.04 ^{ab}	1.38±0.06 ^b	1.12±0.08 ^a	1.06±0.05 ^a	1.11±0.04 ^a	1.08±0.02 ^a
Tyrosine	1.59±0.06 ^c	0.85±0.03 ^b	0.79±0.04 ^{ab}	0.74±0.02 ^{ab}	0.77±0.03 ^{ab}	0.65±0.02 ^a	0.81±0.05 ^{ab}
Total non-EAA	16.79±0.26 ^b	16.68±0.14 ^b	19.86±0.32 ^c	16.50±0.23 ^{ab}	15.65±0.26 ^a	16.20±0.27 ^{ab}	16.67±0.19 ^b
Total AA	24.43±0.55 ^a	25.07±0.39 ^a	28.80±0.54 ^b	23.40±0.49 ^a	23.11±0.58 ^a	23.49±0.51 ^a	24.11±0.44 ^a

Hình 1.5. Thành phần amino axit có trong 7 loài hải sâm ở đảo Nam Du

A. Rasyid cùng các cộng sự nghiên cứu trên hải sâm *H. scabra* tươi đã tìm thấy 16 loại axit amin khác nhau, trong đó có threonine chiếm thành phần chủ yếu cùng nhiều loại khác như leucine, phenylalanine, lysine, valine, isoleucine, histidine, tryptophan [33]. Hoặc nghiên cứu khác từ Omran (2013)

thì chỉ ra rằng lysine là axit amin chính thiết yếu trong loài *A. mauritiana* [24]. Như vậy hàm lượng protein cao trong hải sâm có sự khác nhau về tỉ lệ cũng như thành phần axit amin, phụ thuộc chặt chẽ đến giống loài và các yếu tố địa sinh học khác cũng như phương pháp xử lí.

Chất béo đóng vai trò quan trọng trong thức ăn và là một nguồn năng lượng thiết yếu. Thành phần chất béo góp phần quyết định các đặc tính vật lí của món ăn như mùi thơm, kết cấu, mùi vị, hình thức bên ngoài. Chất béo là nguồn dinh dưỡng cần thiết với nhiều chức năng như bôi trơn khớp và thực hiện các chức năng quan trọng khác. Lipit trong hải sâm chứa các hợp chất như các loại glyceride, phospholipid cùng các acid béo no và không no như lauric, myristic, oleic, linoleic, arachidonic, eicosatrienic... Tuy chỉ chiếm hàm lượng thấp, nhưng vài trong số chúng cũng có giá trị sinh học cao như có tác dụng giúp lọc máu, hỗ trợ điều trị giảm mỡ máu. Ngoài ra chất béo từ hải sâm còn là thành phần chính giúp chữa lành mô và vết thương [34]. Hầu hết các nghiên cứu chỉ ra rằng hải sâm luôn có hàm lượng axit béo không bão hòa đơn (MUFA) là cao nhất, tiếp theo đó là axit béo không bão hòa đa (PUFA) và sau cùng là axit béo bão hòa (SFA). Tất nhiên các thành phần này cũng có sự khác nhau giữa các loài và yếu tố môi trường cũng ảnh hưởng đáng kể. Ridzwan và cộng sự (2014) công bố rằng axit Palmitoleic là thành phần chính trong hải sâm *H. scabra*. Trong khi đó axit urucic là thành phần MUFA chính thu được từ *H. leucospilota* [35].

Vậy thịt hải sâm là một loại thực phẩm tốt cho sức khỏe khi chứa omega 3 (axit linolenic, EPA, DHA) và omega 6 (linoleic và arachidonic), hơn nữa cũng rất thích hợp cho những người hấp thu kém, người già, cơ thể suy nhược hoặc những người bị các bệnh về động mạch, máu nhiễm mỡ. Đây là một sản phẩm thiên nhiên có tác dụng chống oxy hóa, khả năng ức chế phân bào cũng như hỗ trợ hữu hiệu điều trị bệnh xơ vữa động mạch [36].

1.3.2. Thành phần, hàm lượng vitamin và khoáng chất của hải sâm

Phần tro ở hải sâm có chứa các nguyên tố vi lượng. Nhìn chung thành phần khoáng của hải sâm vẫn chưa được chú ý đến nên thông tin vẫn còn hạn chế. Chiếm hàm lượng lớn đa phần là Fe, Zn, Cu, Mg, Ca, Na,... Barzkar và

công sự (2017) báo cáo rằng magie là thành phần chính trong hải sâm *H. arenicola*. Trong khi đó ở loài *H. mammata* là natri, *H. scabra* là canxi [37].

Các vitamin trong hải sâm cũng rất dồi dào và đa dạng như vitamin A, B1, E, B2, B3. Đơn cử như Sroyraya và cộng sự (2017) đã nghiên cứu và chỉ ra hàm lượng vitamin E và vitamin C cao trong loài hải sâm *H. scabra* có trong tự nhiên [38].

Các thành phần vitamin và khoáng chất cũng có sự khác nhau giữa các loài hải sâm, khu vực sinh sống, mùa vụ thu hoạch hay môi trường sinh thái.

1.3.3. Thành phần carbohydrate của hải sâm

Ngoài các thành phần kể trên, thịt hải sâm còn chứa các carbohydrate như đã mô tả ở phần trước. Đây là các polysaccharide sulfate (PS) hay glycosaminoglycans (GAGs), những hợp chất quý giá trong y học, có nhiều hoạt tính sinh học với các tác dụng chữa bệnh hữu hiệu. GAGs là thành phần có giá trị cao nhất ở hải sâm khi mở ra tiềm năng lớn trong lĩnh vực nghiên cứu dược phẩm sinh học từ nguồn tài nguyên biển. Nhiều năm gần đây, các nghiên cứu về hải sâm tập trung xoay quanh tìm hiểu làm rõ thành phần cũng như cấu trúc của GAG trong hải sâm, phân tích sự thay đổi cấu trúc ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học. Tất cả nhằm tìm hướng mới trong việc phát triển công nghệ trích xuất, điều chế hoạt chất sinh học và thuốc chữa bệnh.

1.4. CÁC NGHIÊN CỨU VỀ GLYCOSAMINOGLYCAN TỪ HẢI SÂM TRÊN THẾ GIỚI

Glycosaminoglycans còn thường gọi là mucopolysaccharide là từ ghép bởi glycosamin (đường amin) và glycans (các polysaccharide). Trong mỗi đơn vị disaccharide, thành phần của glycosamin luôn là hexosamin (D-glucosamin hoặc D-galactosamin) chủ yếu ở dưới dạng N-acetyl hóa. GAGs đa phần có chứa nhóm sulfate, được liên kết este với nhóm hydroxyl. Do trong phân tử chứa nhiều các nhóm carboxyl và sulfate nên các polyme sinh học này có điện tích âm cao. Thuật ngữ mucopolysaccharide lần đầu tiên được biết đến bởi sự giới thiệu của Meyer vào năm 1930 nhằm mô tả các polysaccharide chứa hexosamin có nguồn gốc từ động vật. Glycosaminoglycans có mặt ở nhiều mô và các chất lỏng liên kết như da, sụn, thành động mạch vành... ở động vật có xương sống. Sau đó cũng đã có nhiều nghiên cứu báo cáo sự tồn tại của hợp

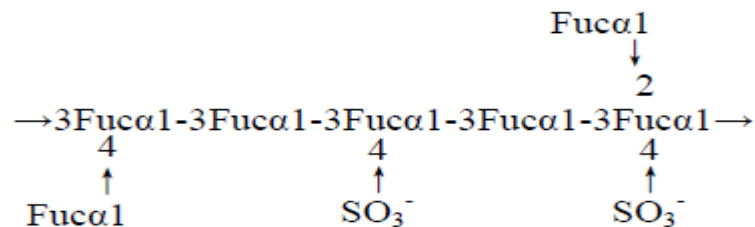
chất này ở động vật không xương sống [39]. Sự tò mò về cấu trúc cũng như sự ảnh hưởng của cấu trúc đến chức năng sinh hóa của GAGs đã làm nở ra nhiều nghiên cứu hơn về hợp chất này. Các nghiên cứu xoay quanh phân tích thành phần, sự đa dạng về cấu trúc cũng như hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của glycosaminoglycans. Trong phạm vi nghiên cứu, bài luận này chỉ nhắc tới glycosaminoglycans được phân lập từ hải sâm.

1.4.1. Thành phần và đa dạng cấu trúc của glycosaminoglycan ở hải sâm

Như đã mô tả ở phần trước, glycosaminoglycans được phân lập từ hải sâm bao gồm hai thành phần chính yếu là FS và FCS.

1.4.1.1 Hợp chất fucan sulfate ở hải sâm

Fucoidan là một polysaccharide sulfate cao phân tử có nhiều trong tự nhiên với cấu tạo chủ yếu là fucose sulfate, được Kylin đặt tên là "fucoidin" khi lần đầu tiên phân lập từ rong nâu biển vào năm 1913 [40]. Fankter và cộng sự dựa vào dữ liệu quá trình methyl hóa trên máy sắc kí khí – quang phổ khối đã cho những gợi ý đầu tiên về cấu trúc của fucoidan [41].



Hình 1.6. Mô hình của Fankter về fucoidan

Cấu trúc của fucoidan được mô tả chủ yếu là một polyme của fucose có liên kết α -(1 \rightarrow 3) với các nhóm sulfate được thay thế ở vị trí C-4. Các nghiên cứu sau đó chỉ ra ngoài các liên kết α -(1 \rightarrow 3) thì còn xuất hiện liên kết α -(1 \rightarrow 4) và xuất hiện nhiều thành phần khác, cấu trúc cũng phức tạp không đồng nhất, khó làm rõ ở rong tảo biển. Điều đó làm nghiên cứu về fucoidan ở hải sâm được quan tâm hơn khi fucoidan ở hải sâm có cấu trúc tuyến tính đồng nhất và thành phần chỉ bao gồm L-fucose và nhóm sulfate, do đó còn được gọi là fucan sulfate.

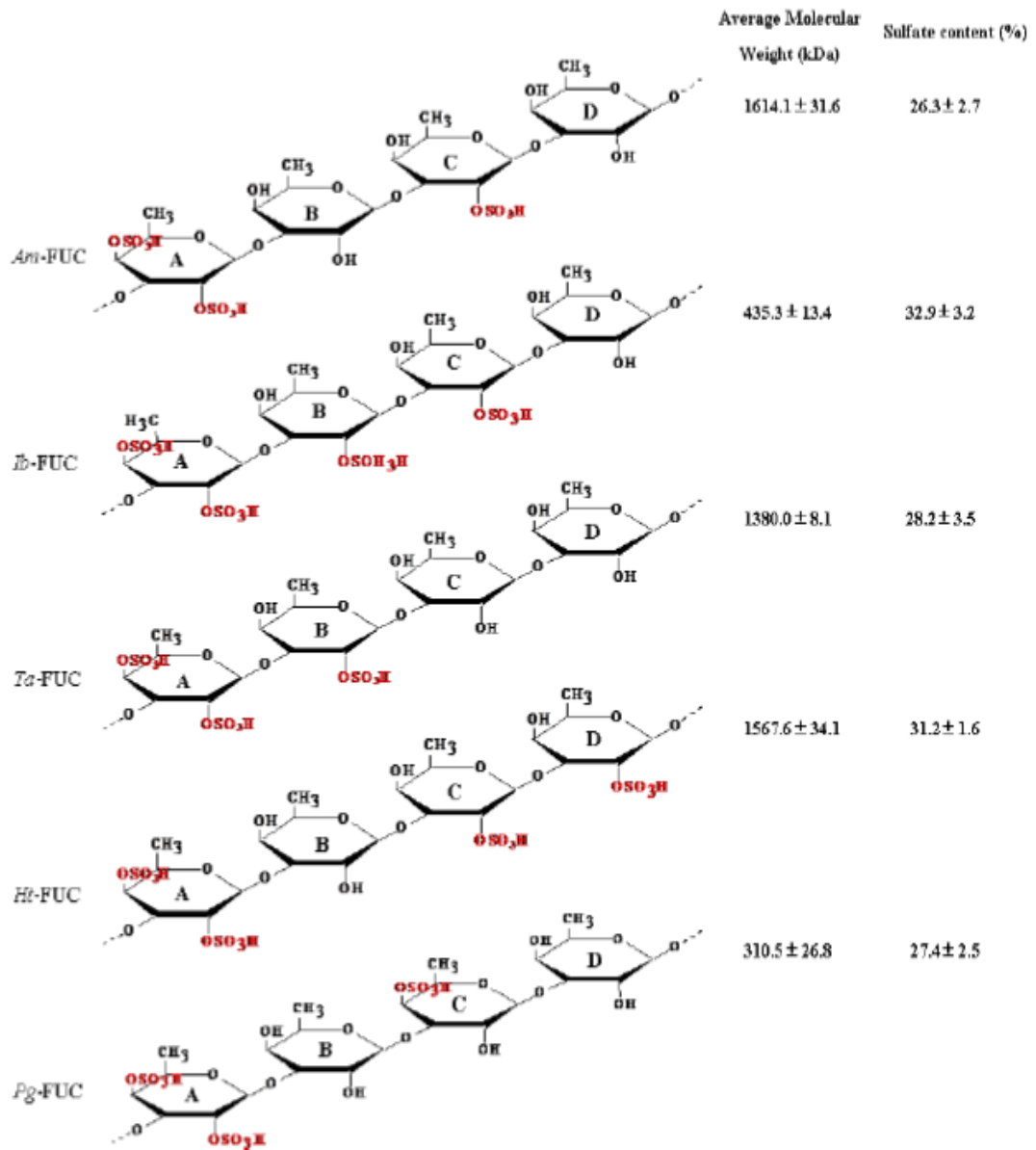
Các báo cáo về fucan sulfate ở hải sâm chỉ ra các cấu trúc lặp lại, liên kết trong mạch là liên kết glycozit ($1\rightarrow3$), ($1\rightarrow4$) và ($1\rightarrow2$), vị trí sulfate hóa trong mạch thường quan sát thấy là 2-O-, 3-O-, 4-O- hoặc 2,4-di-O-sulfate. Vì sự phong phú của loài hải sâm mà các nghiên cứu lần lượt trên các loài hải sâm khác nhau được công bố nhằm làm rõ cấu trúc FS ở mỗi loài, so sánh sự giống và khác nhau cũng như nhằm phát hiện dữ liệu mới.

Gần đây cấu trúc FS ở hải sâm được công bố qua nhiều nghiên cứu, đa số nhấn mạnh đến điểm chung là liên kết α -($1\rightarrow3$) glycozit trong mạch chính các đơn vị oligosaccharide. Về sau còn phát hiện sự có mặt của α -($1\rightarrow4$), do đó fucan sulfate được phân làm 2 nhóm: nhóm chỉ gồm liên kết α -($1\rightarrow3$) và nhóm có liên kết α -($1\rightarrow3$), α -($1\rightarrow4$) xen kẽ trong mạch chính. Các đơn vị lặp lại có thể là tetrasaccharide, pentasaccharide, hexasaccharide, và có sự khác nhau về vị trí sulfate hóa, hàm lượng sulfate, tạo nên tổ hợp đa dạng cấu trúc FS ở hải sâm. Sự đa dạng thể hiện qua cấu trúc liên kết, thành phần monosaccharide, lượng sulfate hóa, mức độ phân nhánh cũng như phân tử khối.

Sau đây là một vài ví dụ cho các nhận định nêu trên. Cấu trúc lặp lại tetrasaccharide được báo cáo trong nghiên cứu của Chen và cộng sự về loài hải sâm *Isostichopus badionotus*. Thành phần lặp lại được mô tả [$3\text{Fuc}2\text{S}4\text{S}-\alpha1,3\text{-Fuc}2\text{S}-\alpha1,3\text{-Fuc}2\text{S}-\alpha1,3\text{-Fuc}\alpha1$] $_n$, trong đó chỉ rõ mạch tetrasaccharide chỉ gồm các liên kết α -($1\rightarrow3$) với các nhóm đường fucose không có nhóm sulfate và sulfate hóa ở vị trí 2-O, 2,4-di-O [42]. Mặt khác, nghiên cứu trên loài *Acaudina molpadioidea* và *Holothuria nobilis* cũng chỉ ra cấu trúc liên kết, thành phần tetrasaccharide tương tự nhưng vị trí, số lượng nhóm sulfate khác nhau. Cụ thể là ở *Acaudina molpadioidea* xuất hiện các gốc 4-sulfate fucose, 3,4-disulfate fucose, 2,4- disulfate fucose trong khi đó ở *Holothuria nobilis* chỉ xuất hiện 2,4- disulfate fucose và 3-sulfate fucose. Các nghiên cứu trên, cùng với nghiên cứu khác về *Holothuria tubulosa* [43], *Pearsonothuria graeffei* [44] cho ta minh chứng về sự đa dạng tỉ lệ cũng như vị trí sulfate hóa trên các monosaccharide ở mạch lặp lại.

Sự khác nhau về đặc điểm liên kết trong mạch còn được báo cáo qua kết quả nghiên cứu về loài *Holothuria fuscopunctata* được thực hiện bởi Gao và nhóm của mình, qua đó cấu trúc độc đáo được mô tả có liên kết α -($1\rightarrow3$), α -($1\rightarrow4$) xen kẽ nhau: [$\text{L-Fuc}2\text{S}4\text{S}-\alpha1,4\text{-L-Fuc}-\alpha1,3\text{-L-Fuc}2\text{S}-\alpha1,4\text{-L-Fuc}$

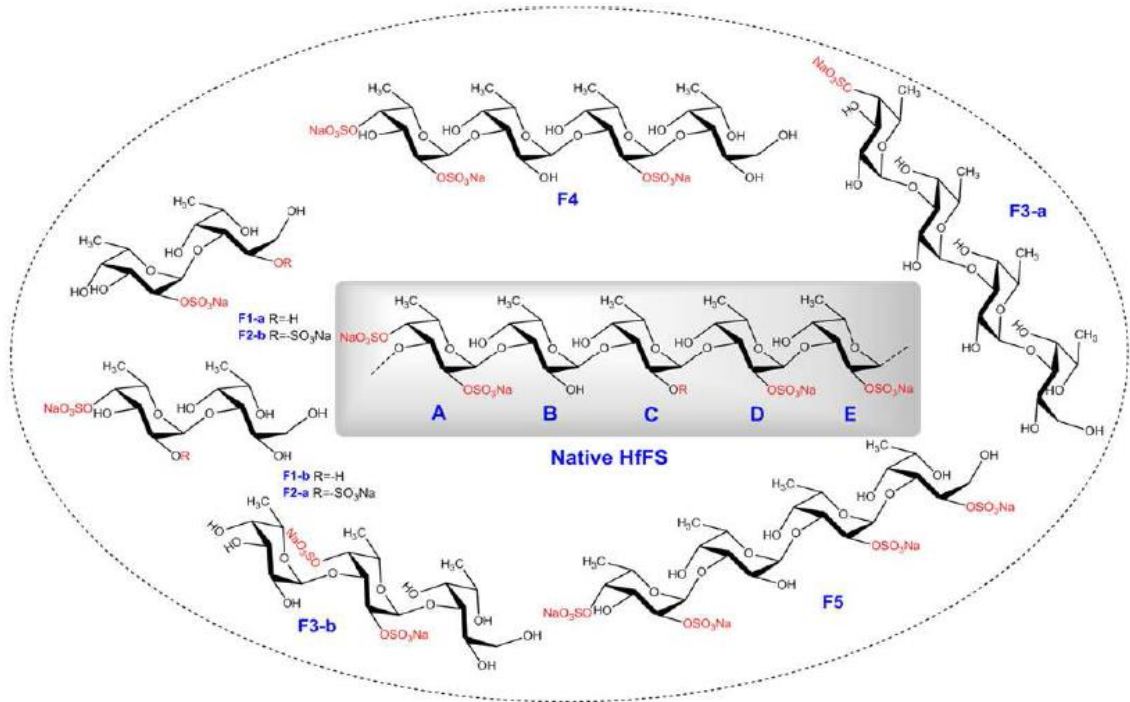
α 1,3-]_n [45]. Nghiên cứu khác bởi TS. Phạm Đức Thịnh và nhóm của ông công bố năm 2017, cho thấy xuất hiện liên kết α -(1→2) và α -(1→3) trong mạch fucan sulfate được phân lập từ loài *Stichopus variegatus* [46].



Hình 1.7. Cấu trúc, phân tử khối và hàm lượng sulfate ở 5 loài hải sâm khác nhau [47][48]. Kết quả trong hình thể hiện sự khác nhau về phân tử khối, hàm lượng sulfate, vị trí sulfate, vị trí liên kết các đường đơn và cả khối lượng phân tử

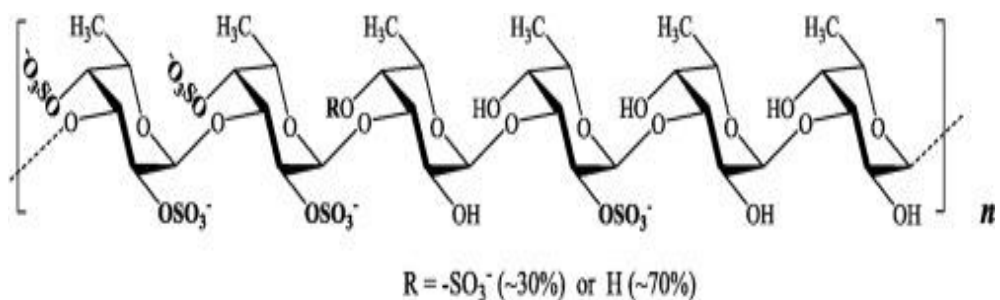
Đơn vị lặp lại không chỉ có tetrasaccharide mà còn có thể là pentasaccharide, hexasaccharide, không những vậy còn có thể xuất hiện mạch nhánh, chứ không hoàn toàn là mạch thẳng như các công bố trước. Cấu tạo mạch pentasaccharide với cấu trúc thẳng được phát hiện ở loài *Holothuria floridana* trong nghiên cứu của Ning và cộng sự: [-L-Fuc2S4S- α (1,3)-L-Fuc-

α (1,3)-Fuc- α (1,3)-L-Fuc2S- α (1,3)-L-Fuc2S- α (1,3)-]n [49]. Trong mô tả này, cấu trúc mạch chính gồm 5 monosaccharide liên kết thẳng với nhau bằng liên kết α -(1 \rightarrow 3) glycozit, có thể không sulfate hóa hoặc xuất hiện sulfate hóa ở vị trí 2-O, 2,4-di-O.



Hình 1.8. Cấu trúc oligosaccharit từ hải sâm *Holothuria floridana*

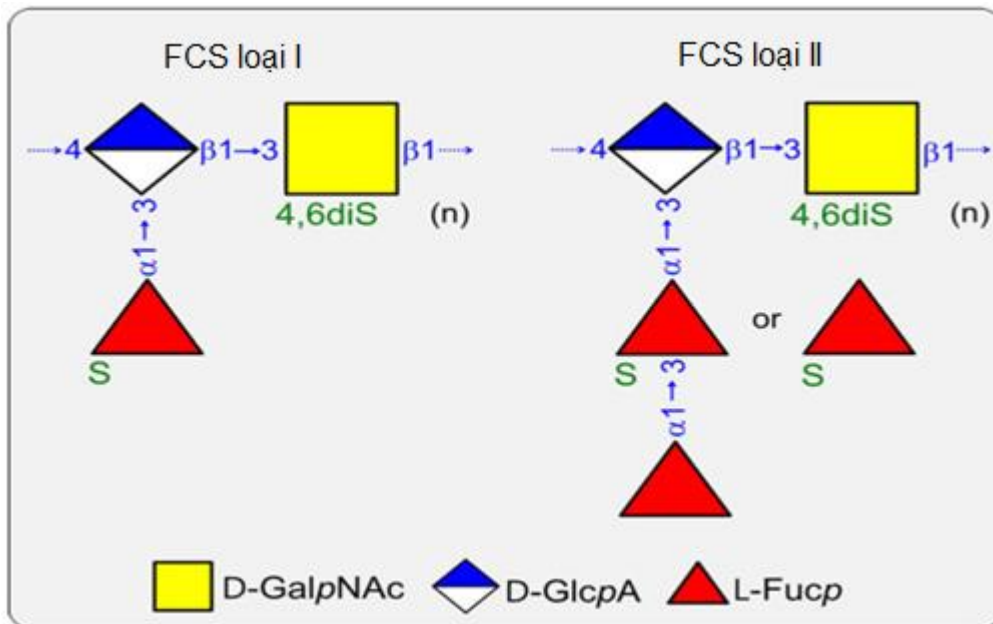
Cũng là mạch lặp lại các pentasaccharide nhưng với cấu trúc phân nhánh chứ không phải mạch thẳng xuất hiện ở loài *Stichopus japonicas* trong mô tả của Long Yu và cộng sự: $[\alpha\text{-L-Fucp}2(\text{OSO}_3^-)\text{-}1 \rightarrow 3, (\alpha\text{-L-Fucp-}1 \rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-}1 \rightarrow)4\text{-}\alpha\text{-Fucp}2(\text{OSO}_3^-)\text{-}1 \rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}2(\text{OSO}_3^-)]$ [50]. Hoặc nghiên cứu khác ở loài *Holothuria albiventer* thì cho ra một fucan sulfate có đơn vị lặp lại là hexasaccharide với cấu trúc thẳng chỉ gồm liên kết α -(1 \rightarrow 3) trong phân tử [51].



Hình 1.9. Cấu trúc fucan sulfate của *Holothuria albiventer*

1.4.1.2 Hợp chất fucosylated chondroitin sulfat ở hải sâm

FCS đã được phân tích làm rõ trên một lượng lớn các loài hải sâm khác nhau. Kết quả cho thấy điểm chung là chúng đều có cấu trúc mạch phân nhánh, trong đó phần lõi là chondroitin $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalNAc-(1}\rightarrow n]$ và mạch nhánh là nhóm fucosyl thường được gắn với O-3 của gốc GlcA. Xuất hiện nhóm fucosyl ở vị trí C-3 ở GlcA chính là cấu trúc độc đáo, khác biệt của FCS hải sâm so với các loại động vật có xương sống khác [52]. Cấu trúc mạch nhánh đặc biệt này được cho là có thể tránh phân hủy bởi tác dụng của enzyme chondroitin được tiết ra từ sinh vật biển, giúp hải sâm thích nghi với điều kiện sống.

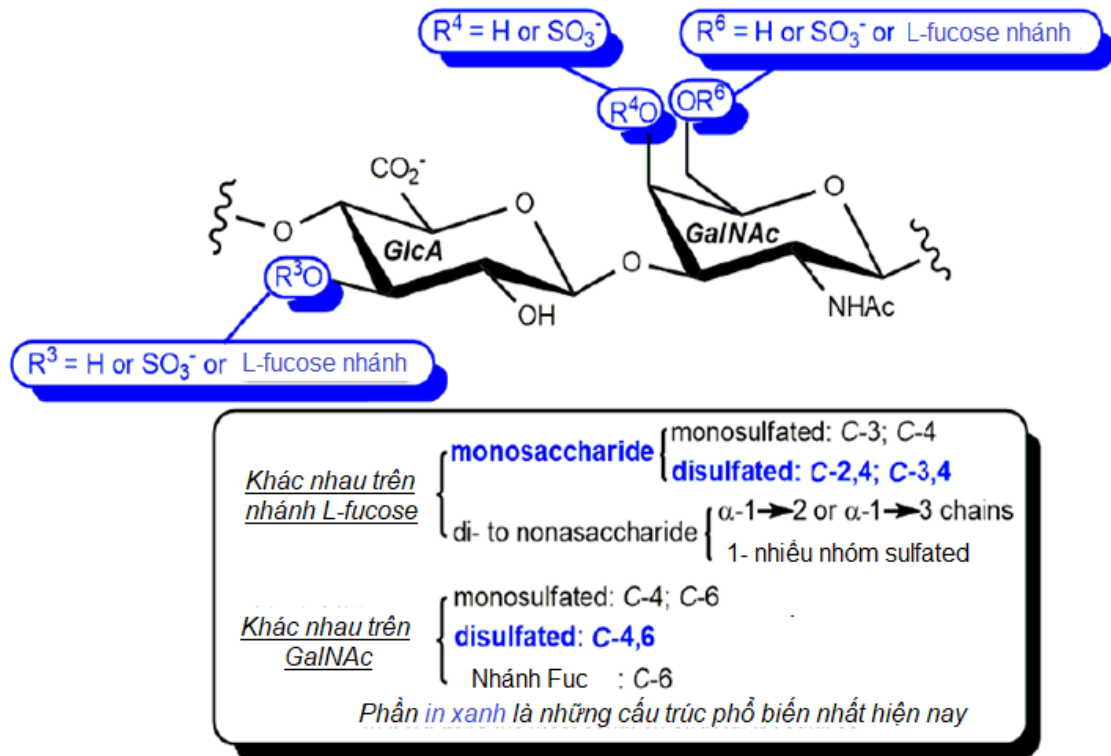


Hình 1.10. Mô tả hai nhóm FCS ở hải sâm [53]

Sự khác biệt dễ thấy nhất giữa các FCS được phân lập từ các loài hải sâm khác nhau có thể được biểu hiện qua số nhóm α -fucose ở mạch nhánh, có thể gồm 1 nhóm (mono) hoặc 2 nhóm (di) [54]. Trên cơ sở này, FCS có thể được chia làm 2 nhóm: nhóm thứ nhất chỉ gồm các monofucosyl, nhóm thứ hai gồm difucosyl hoặc chứa cả monofucosyl lẫn difucosyl.

Chi tiết hơn, các nghiên cứu chỉ ra FCS ở các loài hải sâm có thể khác nhau về nhóm thế ở cả gốc GalNAc và gốc GlcA. Đối với GlcA có thể chứa nhóm fucosyl ở vị trí O-3, hoặc O-2, có khi là cả hai. Sự sulfate hóa trên nhóm này cũng khác nhau, có thể sulfate hóa ở vị trí O-3, O-4 hoặc disulfate ở O-2,4; O-3,4. Đôi khi còn có cả nhóm disaccharide được thế trên GlcA, liên kết trong

nhóm này cũng có thể là α -(1 \rightarrow 3) hoặc α -(1 \rightarrow 2). Các tổ hợp trên cũng đã chứng minh cho sự đa dạng cấu trúc ở nhóm GlcA chứ chưa tính đến trên nhóm GalNAc.



Hình 1.11. Cấu trúc tổng quát FCS ở các loài hải sâm [55]

Một vài cấu trúc được mô tả trong các nghiên cứu gần đây có thể được biết đến như cấu trúc nhánh chứa disaccharide: α -L-Fuc(1 \rightarrow 2)- α -L-Fuc3S-(1 \rightarrow) ở loài hải sâm *Holothuria (Ludwigothuria) grisea* [54]. Cũng tương tự vậy nhưng khác nhau về vị trí sulfate hóa ở các loài *Eupentacta fraudatrix*: α -L-Fuc(1 \rightarrow 2)- α -L-Fuc3S4S-(1 \rightarrow) [56], hoặc liên kết α -(1 \rightarrow 2) lúc này thành α -(1 \rightarrow 3) ở loài *Holothuria lentiginosa*: α -L-Fuc(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc4S-(1 \rightarrow) [57]. Ngoài ra còn có thể tìm thấy các nhánh phức tạp hơn nữa chứa galactose hoặc galactosamin. Nhóm GalNAc có thể bao gồm các nhóm sulfate ở vị trí O-4, O-6 hoặc cả hai, hoặc đôi khi là non-sulfate, hoặc có khi chứa nhánh flucose [56]. Tất cả các yếu tố trên tạo nên sự đa dạng cấu trúc của FCS ở các loài hải sâm khác nhau.

1.4.2. Hoạt tính sinh học và ứng dụng của glycosaminoglycan hải sâm

Từ xa xưa, hải sâm đã được sử dụng không chỉ làm món ăn đơn thuần, mà đó còn là bài thuốc chữa nhiều bệnh. Trong y học cổ truyền Trung Quốc, hải

sâm là nguyên liệu thuốc dùng để chữa các bệnh liên quan đến xương khớp, bổ thận, tráng dương và cả chữa táo bón [58]. Ở Malaysia, dầu chiết xuất từ hải sâm được sử dụng trong các liệu pháp chữa bệnh ngoài da hay đau nhức [59]. Ngày nay, dưới sự phát triển của xã hội, khoa học và kỹ thuật, dược tính của các hoạt chất từ hải sâm đã được làm rõ và chứng minh qua nhiều nghiên cứu. Trong đó các hoạt tính sinh học của GAGs hải sâm được tập trung nghiên cứu rất nhiều, nhằm khai thác giá trị sử dụng đến từ cấu trúc độc đáo của nó. Các giá trị sinh học mang lại được biết đến như hỗ trợ chống virus, chống đông máu, chống huyết khối, chống u, kháng viêm, tăng cường miễn dịch, tăng cường sức khỏe đường ruột.

1.4.2.1 Khả năng chống tế bào ung thư

FCS trong hải sâm đã được nghiên cứu và ghi nhận có khả năng ức chế sự phát triển khối u và giảm di căn phổi. Khi sử dụng FCS ở mức 1, 5 và 20 mg/kg/ngày, điều trị liên tục trong 20 ngày, kết quả cho thấy đã ức chế sự phát triển biểu mô ung thư phổi Lewis lần lượt là 25,8%, 33,1% và 47,2% [60]. Như vậy bên cạnh trọng lượng phân tử thấp, sự ức chế di căn tế bào ung thư biểu mô phổi Lewis của FCS phụ thuộc vào liều lượng sử dụng.

Một nghiên cứu khác của nhóm tác giả Phạm Đức Thịnh (2017) đã khảo sát hoạt tính chống ung thư của GAGs từ 3 mẫu hải sâm *S. variegatus*, *H. spinifera*, *B. Argus* có hàm lượng sulfate cao trên hai loại tế bào ung thư là tế bào ung thư phổi (LU-1) và tế bào ung thư gan (Hep-G2) [61]. Kết quả nghiên cứu cho thấy fucan sulfate từ *H. spinifera* và *B. argus* thể hiện hoạt tính sinh học, trong đó mẫu FS ở *B. argus* ức chế được cả 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với tỷ lệ 78,22% (LU-1); 71,05% (Hep-G2). Còn đối với *H. spinifera* chỉ thể hiện hoạt tính ức chế đối với dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2), với tỷ lệ là 53,15%.

1.4.2.2 Hỗ trợ điều trị nguy cơ bệnh tiểu đường

Sự giảm nhạy cảm của tế bào đối với hormon insulin khiến glucose khó chuyển hóa và vận chuyển tốt qua tế bào. Điều này là dấu hiệu cảnh báo cho sự xuất hiện cũng như phát triển của bệnh tiểu đường. GAGs từ hải sâm được chứng minh có thể giúp cơ thể tăng cường chuyển hóa glucose, do đó có khả năng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường hiệu quả.

Fucoidan được chiết tách từ hai loài hải sâm *Isostichopus badionotus* và *Cucumaria frondosa* được thực hiện bởi Wang và cộng sự (2016) [62]. Thí nghiệm sử dụng liều lượng 80mg/kg/ngày, dùng trong 19 tuần để quan sát tình trạng biến đổi ở chuột với chế độ ăn nhiều chất béo (HFSD). Kết quả cho thấy chúng có thể làm giảm tăng trọng lượng cơ thể (15,6% -25,7%), đường huyết lúc đói (17,6%) và tăng khả năng dung nạp glucose. Với việc bổ sung fucoidan, trọng lượng cơ thể giảm đáng kể 13,3% sau 12 tuần, trong khi RSG đối chứng tích cực không giảm trọng lượng cơ thể. Hơn nữa chúng góp phần điều chỉnh các enzyme liên quan đến chuyển hóa glucose bằng cách tăng hoạt động HK và PK và giảm hoạt động GP và G6Pase ở gan chuột, đồng thời kích thích chuyển protein vận chuyển glucose 4 (GLUT4) sang màng sinh chất. Đây có thể là cơ chế của fucoidan để duy trì cân bằng nội môi glucose. Nghiên cứu sau đó cũng phát hiện ra rằng việc dùng fucoidan từ hải sâm *Pearsonothuria graeffei* với lượng 20 mg và 80 mg/kg/ngày trong 6 tuần, có thể làm giảm liều lượng phụ thuộc vào mức tăng đường huyết lúc đói, insulin và đánh giá mô hình cân bằng nội môi đối với mức độ kháng insulin (HOMA-IR) ở những người cao tuổi [63].

1.4.2.3 Điều trị tình trạng tăng mỡ máu, bệnh béo phì, gan nhiễm mỡ

Bệnh béo phì được cho là một vấn đề sức khỏe cộng đồng đáng được quan tâm khi tỉ lệ người béo phì trên thế giới ngày càng tăng. Công việc bận rộn và thường xuyên sử dụng thức ăn nhanh nhiều dầu mỡ, ít chất xơ cùng công việc ít vận động đã dẫn đến tình trạng đáng báo động trên. Nguy cơ về các bệnh lí về tim mạch, ung thư, tiểu đường cũng từ đó mà tăng cao.

Fucoidan từ hải sâm *Acaudina molpadioides* [64] và *Isostichopus badionotus* [63] dùng ở liều 80mg/kg/ngày làm giảm hàm lượng chất béo dưới da, quanh thận trên thí nghiệm ở chuột béo phì do HFFD gây ra. Thí nghiệm diễn ra trong 13 đến 19 tuần và cho kết quả khả quan. Thí nghiệm dùng các liều lượng khác nhau, fucoidan từ các loài hải sâm khác nhau cho ra kết quả khác nhau. Hơn nữa, kích thước tế bào mỡ trong nhóm fucoidan nhỏ hơn so với nhóm HFD, điều này chỉ ra rằng fucoidan có thể làm giảm sự tích tụ lipid trong các mô mỡ và do đó làm giảm trọng lượng cơ thể. Trong các nhóm sử dụng fucoidan, kết quả mô học của gan cho thấy cấu trúc tương đối bình thường của các tiểu thùy gan và sự thoái hóa mỡ của các tế bào gan được cải thiện đáng kể.

1.4.2.4. Hoạt tính kháng viêm

Hoạt tính kháng viêm của GAGs hải sâm được thí nghiệm trên chuột bị viêm phúc mạc, viêm tai, viêm ruột cấp tính.

FCS là hợp chất chống viêm được nghiên cứu nhiều nhất của hải sâm. Panagos và cộng sự (2014) phát hiện ra rằng FCS oligosacarit được chiết xuất từ hải sâm *Holothuria forskali* có thể làm giảm thâm nhiễm bạch cầu trung tính trong thí nghiệm ở chuột bị viêm màng bụng [65]. Thí nghiệm khác trên chuột bị viêm do béo phì được thực hiện bởi Li và cộng sự (2019) đã sử dụng lượng 20 mg và 40 mg/kg/ngày FCS từ hải sâm *Isostichopus badionotus* trong sáu tuần. Kết quả cho thấy có sự ức chế đáng kể mức độ cytokine gây viêm của TNF- α huyết thanh và cũng làm giảm các đại thực bào xâm nhập vào mô mỡ chuột [66]. FCS từ *Acaudina molpadioides* được truyền qua dạ dày với liều 80mg/kg/ngày trong 10 tuần đã làm giảm đáng kể các cytokine tiền viêm huyết thanh bao gồm TNF- α , IL-1 β , IL-6, MMP-9 đồng thời tăng interleukin-10, một chất kháng viêm. Castillo cùng cộng sự (2020) cũng đã thử nghiệm tác dụng chống viêm của FCS trong thí nghiệm điều trị viêm tai ở chuột và cho thấy tác dụng làm giảm viêm và tổn thương mô rõ rệt. Hơn nữa, thí nghiệm cho thấy rằng chỉ với 4,5% (w/w) sulphate có thể đủ để tối đa hóa hoạt động chống viêm của nó [67].

1.4.2.5. Điều trị rối loạn miễn dịch

Trong một nghiên cứu của Niu và cộng sự (2020), khả năng tăng cường miễn dịch của hai FCS từ *Holothuria poli* và *Holothuria tubulosa* đã được quan sát. Nghiên cứu cho thấy sự phục hồi của hoạt động miễn dịch sau khi bị ức chế bởi cyclophosphamide ở chuột. Tín hiệu được thể hiện thông qua sự cải thiện đáng kể về công thức máu (tỉ lệ bạch cầu, hồng cầu, bạch cầu trung tính, tế bào lympho và tiểu cầu), ngăn chặn việc sản xuất quá mức các cytokine gây viêm (TNF- α và IL-6). Ngoài ra còn quan sát thấy có sự cải thiện các đặc điểm mô bệnh học, giảm tổn thương lá lách sau khi điều trị bằng FCS [68]. FCS từ *Apostichopus japonicus* được coi là chất kích thích tạo máu, khi tiêm dưới da ở mức 0,5 mg/mL trong 3 ngày trên mô hình chuột bị ức chế miễn dịch do cyclophosphamide gây ra. Nó có thể kích thích giải phóng các tế bào bạch cầu và hồng cầu cũng như tiểu cầu từ tủy xương và khôi phục chúng về mức kiểm soát; tăng số lượng bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân và tế bào lympho

để cân bằng thành phần bạch cầu. Việc bình thường hóa mức độ của cytokine tiền viêm IL-6 trong huyết thanh và sự phục hồi của các tế bào trong lá lách cũng đã được quan sát thấy trên mô hình chuột sau khi điều trị bằng FCS [69].

1.4.2.6. Khả năng làm tan huyết khối

Huyết khối là hiện tượng hình thành cục máu đông do các bệnh lí về mạch máu hay buồng tim, gây tình trạng tắc mạch máu và dẫn đến các tình trạng nghiêm trọng ở bệnh nhân như nhồi máu cơ tim, đột quỵ, hoại tử các chi. Các phương pháp điều trị huyết khối chính là dùng thuốc làm loãng máu hoặc phẫu thuật can thiệp bằng cách đặt stent, ống thông nhằm mở các mạch bị tắc. Tuy nhiên cũng có thể sử dụng một số thực phẩm chức năng có tác động làm loãng máu tự nhiên và giúp giảm nguy cơ hình thành cục máu đông. Các hợp chất có nguồn gốc từ hải sâm bao gồm FCS và FS đã được nghiên cứu và cho thấy các hoạt động chống huyết khối vượt trội của chúng.

Một đoạn depolyme hóa ($M_w \sim 8,5$ kDa) của FCS ($M_w \sim 65,8$ kDa) được chiết xuất từ hải sâm *Thelepena ananas* trong nghiên cứu của Wu và cộng sự (2015) cho thấy khả năng ức chế tốt sự hình thành huyết khối tĩnh mạch ở liều 14,8 mg/kg, kết quả này là cao hơn so với các FCS ở cùng liều lượng (85% so với 35%) [70]. FCS này làm tăng đáng kể quá trình tan huyết khối ở mức 53mg và 106mg/kg (gấp khoảng 3,5 và 7,5 lần liều cần thiết để ức chế huyết khối tĩnh mạch) khi tiêm vào lưng và dưới da chuột. Một FCS tinh khiết cao khác, được phân lập từ hải sâm *Pearsonothuria graeffei* đã ức chế chọn lọc phức hợp yếu tố nội tại Xase và thể hiện hoạt tính chống huyết khối đáng chú ý mà không xảy ra tác dụng phụ như xuất huyết và hạ huyết áp cũng được trình bày trong nghiên cứu của Yan và cộng sự (2019) [71]. Nhóm nghiên cứu đã tập trung sâu hơn vào FCS ($M_w \sim 3347$ Da) và phát hiện ra rằng công thức vi nang kháng oligomer-gastro-gastro (GR) của FCS đại diện cho một chất chống đông hiệu quả và an toàn. Mô hình thí nghiệm trên chuột mang huyết khối tĩnh mạch đã chứng minh rằng các oligome FCS được vận chuyển qua các viên nang siêu nhỏ GR tạo ra tác dụng chống huyết khối mạnh phụ thuộc vào đặc tính chống đông máu của chúng trong huyết tương.

Như vậy các GAGs từ hải sâm có những hoạt tính sinh học tuyệt vời và đa dạng có thể do sự khác nhau về cấu trúc phân tử, phân tử khối hoặc mô hình sulfate trong mạch [72]. Với sự đa dạng các loài hải sâm, phân bố rộng rãi trên

thế giới, việc nghiên cứu làm rõ cấu trúc cũng như hoạt tính sinh học của GAGs hải sâm là một công trình lớn thu hút sự tham gia của nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới. Loài *H. leucospilota* cũng là loài có phân bố rộng, tuy nhiên có rất ít tài liệu về GAGs của loài này, chỉ có vài nghiên cứu đề cập tới phân lập và thí nghiệm hoạt tính sinh học trên chuột, số khác quan tâm tới hình thái, thành phần dinh dưỡng, đặc tính sinh sản của *H. leucospilota*. Đặc trưng cấu trúc GAGs của *H. leucospilota* vẫn còn chưa được làm sáng tỏ.

1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU GLYCOSAMINOGLYCAN TỪ HẢI SÂM Ở VIỆT NAM

Việt Nam là một đất nước ven biển với trữ lượng tài nguyên thủy hải sản dồi dào. Người dân sinh sống ven biển bằng nghề chài lưới chiếm số lượng đáng kể và giao thương hàng hải cũng chiếm tỉ trọng cao trong nền kinh tế cả nước. Lĩnh vực nghiên cứu, tìm kiếm và phát triển nguồn lực biển cũng được nhà nước và giới khoa học quan tâm, thúc đẩy. Nhiều loài hải sâm ở Việt Nam có giá trị kinh tế cao cũng đã và đang được nghiên cứu trong các công trình liên quan đến phân tích hình thái, môi trường sống, sinh sản nhằm hướng tới nuôi trồng, giảm thiểu tác động từ việc khai thác quá mức trong tự nhiên. Số khác lại được quan tâm đến thành phần dinh dưỡng nhằm nâng cao giá trị thương mại, thúc đẩy kinh tế. Bên cạnh đó còn có những nghiên cứu xoay quanh việc tái chế phụ phẩm từ quá trình chế biến hải sâm nhằm bảo vệ môi trường, tìm ra hướng giải quyết mới.

Chỉ có số ít các loài hải sâm được chiết tách, nghiên cứu cấu trúc GAGs và hoạt tính sinh học. Trong đó có thể kể đến những nghiên cứu của tác giả Phạm Đức Thịnh và nhóm nghiên cứu ở Viện nghiên cứu và ứng dụng công nghệ Nha Trang trên các loài hải sâm *Stichopus variegatus* [48], loài *Holothuria edulis* [73], *Bohadschia argus* và *Holothuria (Theelothuria) spinifera* [74],... Các nghiên cứu đã đạt được một số kết quả có ý nghĩa nhất định, làm rõ những khía cạnh khác nhau của GAGs từ hải sâm ở Việt Nam.

Ở loài *Stichopus variegatus* được nghiên cứu phân lập, phân tích làm rõ cấu trúc GAGs, cùng với đó là thí nghiệm hoạt tính chống ung thư ở loài này. Kết quả cho thấy ở loài *Stichopus variegatus* thu thập từ Vịnh Nha Trang, sau khi chiết tách GAGs và phân lập cho thấy có chứa cả FCS và FS như các nghiên

cứu khác. Trong đó cấu trúc FS độc đáo nên được nghiên cứu làm rõ đặc trưng cấu trúc bằng phổ NMR. FS ở *Stichopus variegatus* bao gồm các liên kết 1,2 và 1,3- α -L-fucopyranose trong mạch. Vị trí sulfate hóa trong mạch có thể là 2-O hoặc 4-O hoặc 2,4-di-O, ngoài ra có thể có một lượng nhỏ sulfate hóa ở vị trí C3. Hoạt tính sinh học từ FS ở loài này cũng được làm rõ trên các nền tế bào ung thư vú ở người T-47D và các dòng tế bào khác MDA-MB-231. Kết quả cho thấy fucan sulfated ở *Stichopus variegatus* không tác dụng gây độc các dòng tế bào ung thư này và nó có khả năng ức chế sự hình thành khuẩn lạc của các tế bào đó trong ống nghiệm [48].

Ở nghiên cứu được thực hiện bởi Đinh Thành Trung (2020) cùng cộng sự trên loài *Holothuria edulis* [73] cho thấy GAGs cũng bao gồm FCS và FS. Trong đó GAGs được tinh sạch và xác định bao gồm 3 phân đoạn, với các phân đoạn có các thành phần gốc âm ở mức độ khác nhau. Phân đoạn F1 và F2 thuộc FCS, phân đoạn F3 thuộc FS. Các phân đoạn được phân tích phổ IR, xác định được vị trí sulfate hóa ở F1, F2 chủ yếu là C2, C3 hoặc cả C2 và C3. Trong khi đó ở F3 chỉ sulfate hóa ở vị trí C4. Sau đó các phân đoạn GAGs thô và GAGs tinh sạch F1, F2, F3 đều được tiến hành nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn. Kết quả cho thấy chỉ có F2 có hoạt tính kháng khuẩn, ức chế sự phát triển của 3/8 mẫu chủng vi khuẩn kiểm định bao gồm *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* và *Pseudomonas aeruginosa*. Trong khi đó ở các mẫu GAGs thô hay F1, F3 đều cho kết quả âm tính. Nghiên cứu khẳng định thêm tầm quan trọng của vị trí thế, hàm lượng sulfate hóa ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính sinh học của GAGs hải sâm.

Ngoài ra, các GAGs từ hải sâm cũng là đề tài nghiên cứu được báo cáo trong các luận văn được thực hiện bởi Mai Ngô Thương Hoài và cộng sự (2019) [75] trên loài hải sâm *Holothuria atra*, Dương Khánh Minh và cộng sự (2020) [76] trên loài hải sâm *Stichopus horrens*. Gần đây nhất, nhóm nghiên cứu ở Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang cùng với nhóm các nhà khoa học tại Viện Hóa học hữu cơ Zelensky, Viện Hàn lâm Khoa học Nga, L. B. Nga đã công bố những kết quả nghiên cứu về cấu trúc và hoạt tính sinh học của glycosaminoglycan từ loài hải sâm *Bohadschia argus* và *Holothuria (Theelothuria) spinifera* [74].

Nhìn chung, vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về glycosaminoglycan từ hải sâm ở Việt Nam. Mặc dù nước ta có nguồn hải sâm rất đa dạng và phong phú về loài cũng như trữ lượng. Do đó, việc tiếp tục nghiên cứu bổ sung thêm các cơ sở khoa học về nhóm hoạt chất từ hải sâm ở Việt Nam vẫn hết sức cần thiết. Loài hải sâm *H. leucospilota* thuộc nhóm loài có phân bố phổ biến khắp các vùng biển từ Bắc vào Nam, tuy nhiên hiện nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về nhóm hoạt chất glycosaminoglycan từ loài hải sâm này ở Việt Nam

Như vậy, từ những phân tích tổng quan tài liệu nêu trên, đề tài: **“Phân tích đặc trưng cấu trúc glycosaminoglycan được chiết tách từ hải sâm *Holothuria leucospilota* (Brandt, 1835)”** được đề xuất thực hiện nhằm đóng góp thêm các nghiên cứu về các hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm ở Việt Nam.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là các hợp chất glycosaminoglycan (GAGs) được chiết tách từ hải sâm *Holothuria leucospilota* thu thập ở vùng biển Thanh Mai (Quảng Ninh, Việt Nam) vào thời điểm tháng 6 năm 2021, trong hành trình khảo sát nghiên cứu đa dạng sinh học và hóa sinh của tàu Viện sĩ “Oparin” trong vùng biển Việt Nam. Mẫu vật được thu thập một cách ngẫu nhiên bằng cách lặn bắt bằng tay. Mẫu được đựng trong thùng xốp có nắp đậy, chứa nước biển, sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu hải sâm được phân loại bởi ThS. Nguyễn An Khang, chuyên gia phân loại động vật biển không xương sống thuộc Viện Hải Dương Học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.2. Dụng cụ , thiết bị, hóa chất

2.1.2.1. Dụng cụ

- Các dụng cụ sử dụng trong phòng thí nghiệm như: ống nghiệm, bình cầu, bình tam giác, cốc thủy tinh, ống đong, pipet, cuvet thạch anh, ống ly tâm...
- Micropipet các loại 100 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l (Sartorius, Đức) và đầu tip.
- Xylanh, màng lọc xylanh 0.22 μ m Nylon (Merck, Đức).
- Vial 5mL có nắp (Thermoscientific, Mỹ).

2.1.2.2. Thiết bị

- Hệ thống phân tích thành phần carbohydrate: hệ thống sắc ký trao đổi ion Dionex ICS-6000 (Thermo Scientific, Mỹ); cột phân tích trao đổi anion CarboPac MA1 (250mm x 4); cột bảo vệ CarboPac MA1 (50 mm x 4); đầu dò điện hóa (Electrochemical Detector-ED).
- Hệ thống sắc ký thẩm thấu gel (GPC - Gel Permeation Chromatography) (Shimadzu – Nhật) gồm: bơm dung môi LC-20AD, bộ khử khí chân không DGU-20A5R, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20A HT, buồng điều nhiệt cột CTO-20A, đầu dò khúc xạ (RID - Refractive Index Detectors) RID-20A, cột GPC/SEC Suprema Ultrahigh 10 μ m (8 x 300 mm) (Đức).
- Máy phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$: Bruker WM-500.
- Thiết bị phân tích phổ hồng ngoại: IRAFFINITY -1S (Shimadzu - Nhật Bản).

- Hệ thống thu phân đoạn tự động (Biorad – Mỹ).
- Máy li tâm siêu tốc: eppendorf, Z446K (Hermle-Đức).
- Máy đông khô: LyoQuest Plus ECO 50 (Telstar, Spain).
- Máy cô quay chân không: N-1300V-WB (EYELA- Nhật Bản).
- Màng siêu lọc MWCO 10kDa.
- Máy đo quang: UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu – Nhật).

2.1.2.3. Hóa chất

- Các hóa chất phân tích: L-Cystein, N-Acetyl galactosamin, N-Acetyl glucosamin, Glucuronic acid, D-Galactose, L-Fucose, D-Glucose, D-glucuronic acid (Sigma – Đức), EDTA, CH₃COONa, CH₃COOH, NaHB₄, NH₄OH, Na₂SO₄, K₂SO₄, NaOH, TCA (Tricloacetic acid), Gelatin, BaCl₂, TFA (Trifluoroacetic acid), nhựa trao đổi ion DEAE-Macro prep, màng thẩm tách kích thước 10 kDa.

- Các hóa chất khác sử dụng trong nghiên cứu: Enzyme Papain xuất xứ Ấn Độ, hoạt độ 2000 UI/g; Ethanol 98% (Việt Nam); Aceton (Trung Quốc-TQ); HCl (TQ); NaCl (TQ); H₂SO₄(TQ); NaOH (TQ).

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

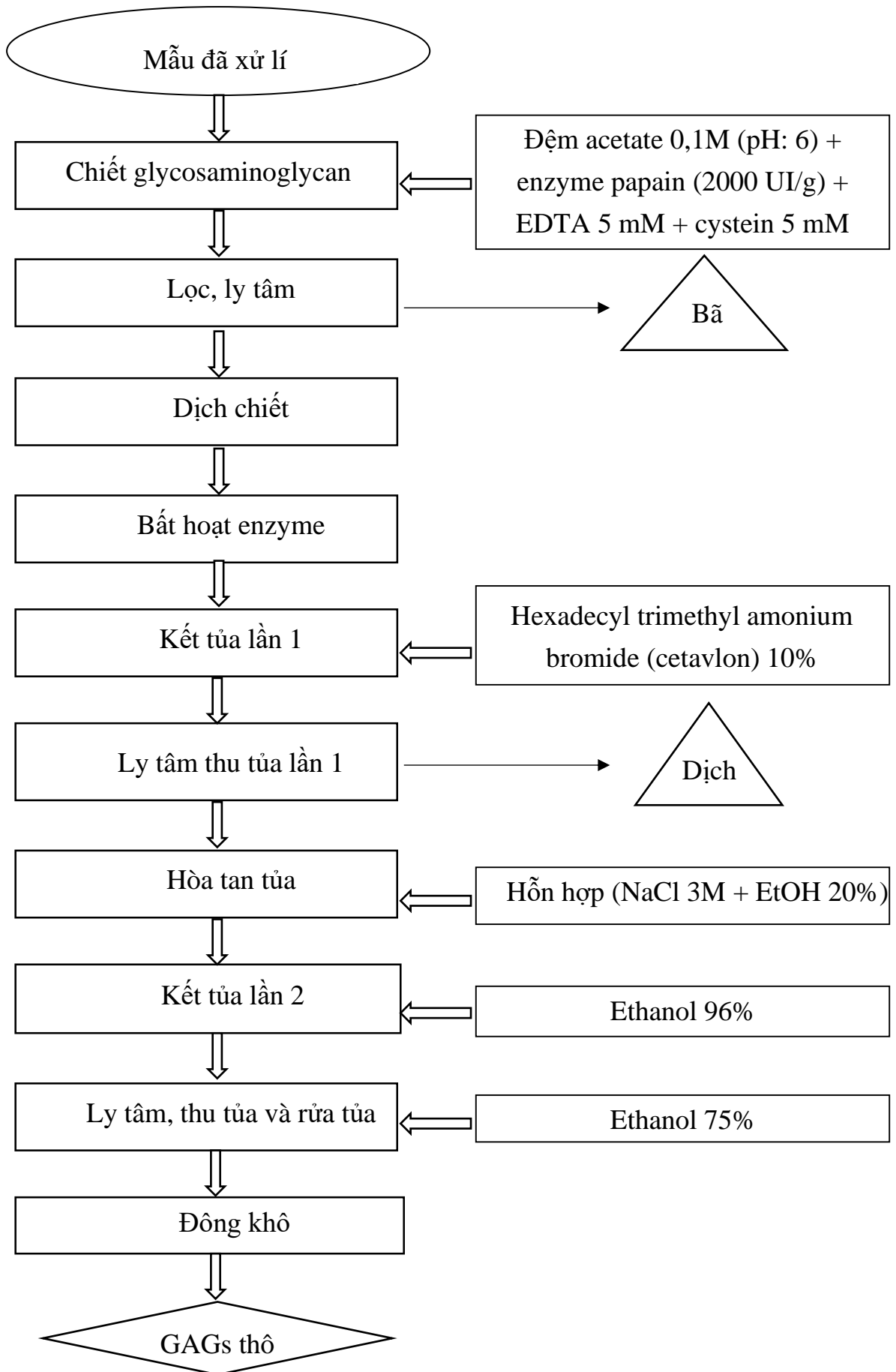
2.2.1. Phương pháp xử lý và bảo quản mẫu

Mẫu hải sâm sau khi thu hoạch được rửa sạch cát, bảo quản trong thùng giữ mẫu có đá khô và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Sau đó tiến hành loại bỏ nội tạng, rửa sạch và ngâm xử lý lần lượt trong ethanol 98% từ 2 đến 3 ngày, tiếp đó là aceton trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng mẫu được cắt nhỏ, phơi khô và được dùng để chiết GAGs.

2.2.2. Phương pháp chiết tách và phân lập glycosaminoglycan từ hải sâm

2.2.2.1 Phương pháp chiết tách glycosaminoglycan

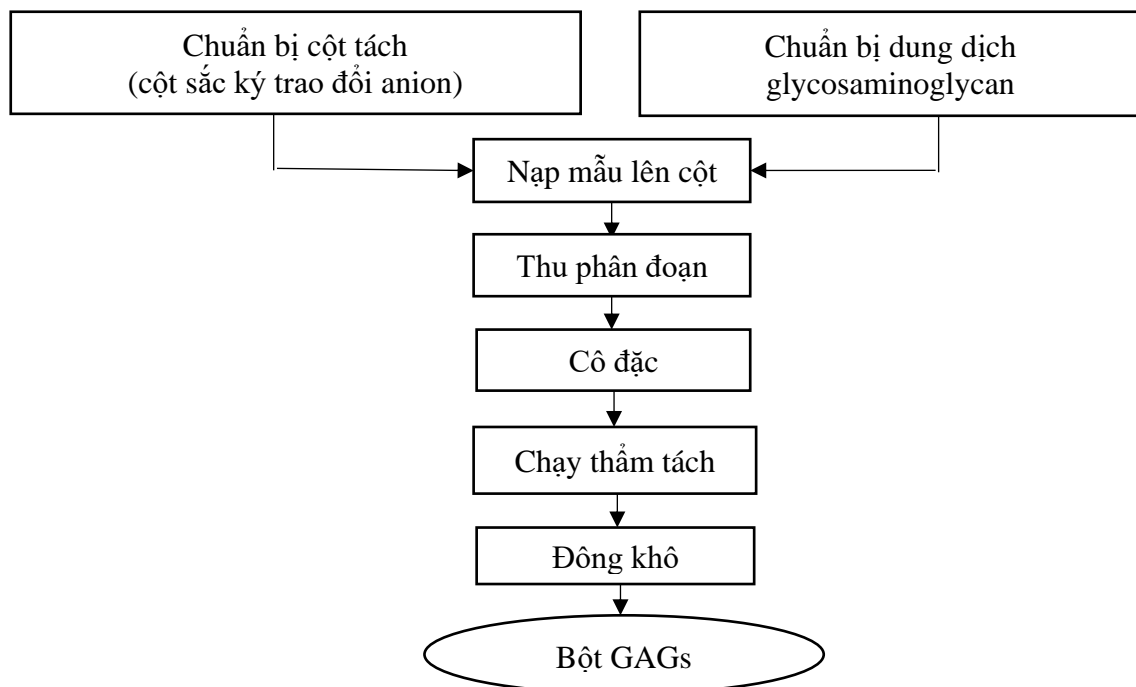
Phương pháp chiết tách glycosaminoglycans (GAGs) từ hải sâm thực hiện dựa theo phương pháp được mô tả trong nghiên cứu của Phạm Đức Thịnh và cộng sự [77]. Phương pháp chiết tách GAGs được tóm tắt theo sơ đồ sau:



Hình 2. 1. Sơ đồ quy trình chiết tách GAGs từ hải sâm *H. leucopilota*

Quy trình chiết tách GAGs được tiến hành như sau: mẫu hải sâm khô được chiết trong đệm acetate 0,1M; pH=6 có chứa 10% enzyme papain (2000 UI/g), 5 mM EDTA và 5 mM L-cystein. Tỷ lệ giữa nguyên liệu và dung môi chiết là 1/30 (W/V). Quá trình chiết được thực hiện ở nhiệt độ 55 °C trong 24 giờ. Sau đó tiến hành lọc dịch chiết bằng vải lọc thô, dịch chiết được đun sôi trong thời gian 10-15 phút để bất hoạt enzyme. Để nguội dịch chiết đến nhiệt độ phòng, sau đó đem li tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút loại bỏ phần cặn và thu phần dịch trong. Tiếp theo, dung dịch Cetavlon 10% được thêm vào dịch chiết để kết tủa GAGs, hỗn hợp kết tủa được để lắng trong 24 giờ ở 4 °C. Li tâm hỗn hợp ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 phút để thu kết tủa. Phức kết tủa Cetavlon và GAGs được hòa tan trong hỗn hợp (NaCl 3M và ethanol 20%), tiếp đó thêm ethanol 98% đến khi thu được ethanol cuối cùng có nồng độ đạt 80%. Quá trình này nhằm kết tủa để thu nhận GAGs trong ethanol 80%. Kết tủa GAGs trong ethanol được để lắng trong thời gian khoảng 24 giờ, ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 phút để thu kết tủa, kết tủa được rửa nhiều lần với ethanol 75% (từ 3 đến 5 lần) để loại bỏ muối. Kết tủa được hoàn tan lại trong nước cất, sau đó đem đông khô thì thu được GAGs ở dạng thô.

2.2.2.2. Phương pháp tách phân đoạn tinh sạch glycosaminoglycan hải sâm



Hình 2.2. Phân đoạn tinh chế GAGs bằng sắc ký trao đổi anion trên nhựa DEAE Macro-prep

GAGs thô từ hải sâm được tiến hành tách phân đoạn tinh chế theo phương pháp sắc ký trao đổi anion trên cột DEAE-Macro prep. Cụ thể, được thực hiện như mô tả theo sơ đồ hình 2.2.

Giải thích quy trình:

- Chuẩn bị dung dịch mẫu GAGs: 500 (mg) GAGs dạng thô, được hòa tan hoàn toàn trong 50 ml dung dịch đệm acetate 0,1 M (pH 5). Sau đó, ly tâm dung dịch ở 6.000 vòng/phút trong 20 phút. Loại bỏ cặn (nếu có), thu phần dịch trong để sử dụng cho chạy tách phân đoạn bằng sắc ký trao đổi anion trên cột DEAE-Macro Prep (1,6 x 40 cm).

- Cột sắc ký được hoạt hóa và cân bằng bằng cột sử dụng dung dịch đệm acetate 0,1M (pH=5).

- Tiến hành tách phân đoạn: mẫu đã chuẩn bị được đưa lên cột tách, sau đó tiến hành chạy rửa cột với dung dịch đệm acetate 0,1M (pH=5) đến khi dung dịch đầu ra cột thử có kết quả âm tính carbohydrate (sử dụng phương pháp thử phenol/sulfuric acid). Quá trình rửa giải tách phân đoạn được thực hiện theo gradient tăng dần nồng độ muối NaCl từ 0,1-2,0M, tốc độ rửa giải 0,8 ml/phút. Mẫu rửa giải khỏi cột tách được thu bằng hệ thống thu mẫu tự động với mỗi 10 ml/ống thu.

- Việc xác định và thu nhận các phân đoạn GAGs được phân tách khỏi cột sắc ký bằng đánh giá hàm lượng tổng carbohydrate theo phương pháp phenol-sulfuric acid. Các phân đoạn thu nhận được đem thẩm tách loại muối bằng màng thẩm tách kích thước 10kDa trong nước cất, sau đó cô đặc để giảm thể tích trước khi tiến hành đông khô thu GAGs dạng tinh chế.

2.2.3. Các phương pháp phân tích thành phần hóa học của glycosaminoglycan

2.2.3.1. Xác định hàm lượng sulfate

Hàm lượng sulfate được xác định bằng phương pháp đo độ đục với BaCl₂/gelatin (KS Dodgson và cộng sự, 1962) [78], sử dụng K₂SO₄ làm dung dịch chuẩn.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: 5 mg mẫu được cân trong lọ vial 5ml có nút vặn chặt, thêm vào 2 ml HCl 1N sau đó đem thủy phân mẫu ở nhiệt

độ 100 °C trong 6 giờ. Hàm lượng sulfate trong mẫu sau thủy phân được xác định bằng phương pháp đo độ đục khi cho kết tủa với BaCl₂ trong môi trường 5% gelatin. Phản ứng được giữ 10 - 15 phút ở nhiệt độ phòng sau đó đem đo độ đục ở bước sóng $\lambda = 360$ nm.

2.2.3.2. Xác định hàm lượng tổng carbohydrate

Tổng carbohydrate được xác định bằng phương pháp phenol – sulfuric acid (Dubois và cộng sự 1956) [79], sử dụng D-glucose làm dung dịch chuẩn.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: lấy 200 μ l dung dịch cần phân tích, thêm vào 200 μ l thuốc thử phenol 5%, lắc đều đến khi dung dịch trong suốt. Thêm tiếp 1 ml dung dịch sulfuric acid đậm đặc, sau đó lắc đều rồi đem đun cách thủy trong 5 phút. Lấy ra để nguội rồi đo mật độ quang ở bước sóng $\lambda = 490$ nm.

2.2.3.3. Xác định thành phần đường đơn của glycosaminoglycan

Thành phần đường đơn được xác định theo phương pháp của Dong và cộng sự [1].

Thí nghiệm được tiến hành như sau: GAGs được thủy phân về các monomer bằng acid TFA 2N (Trifluoroacetic acid) trước khi tiến hành phân tích bằng HPLC (High-performance liquid chromatography–HPLC) ICS-6000 trên cột Dionex CarboPac MA1, đầu dò điện hóa (Electrochemical Detector-ED). Pha động là NaOH 1 M, tốc độ dòng 0,4 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 500 μ l, thời gian phân tích là 30 phút đối với dung dịch chuẩn và 60 phút đối với mẫu thử. Các đường đơn D-Galactose, L-Fucose, N-Acetyl-galactosamine, N-Acetyl-glucosamine được sử dụng để tiến hành xây dựng đường chuẩn. Thành phần các đường đơn trong mẫu phân đoạn GAGs được thể hiện theo % tỷ lệ mol dựa vào các đường đơn chuẩn [80].

2.2.3.4. Phương pháp xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp của Lowry [81], sử dụng Albumin huyết thanh bò (BSA – Bovine serum albumin) làm dung dịch chuẩn.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: 0,5 mL dung dịch cần phân tích được cho vào ống nghiệm, thêm vào 2,5 mL dung dịch C (hỗn hợp dung dịch

A ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaOH}$) và dung dịch B ($\text{CuSO}_4 + \text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) theo tỉ lệ 50:1). Phản ứng được để yên 20 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm tiếp vào hỗn hợp phản ứng 0,25 mL thuốc thử Folin 0,5M, để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 phút và tiến hành đo quang ở bước sóng $\lambda = 750 \text{ nm}$.

2.2.3.5. Phương pháp xác định hàm lượng uronic acid

Hàm lượng uronic acid được xác định bằng phương pháp Carbazole (Bitter và Muir, 1962) [82], sử dụng D-glucuronic acid làm dung dịch chuẩn.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: lấy 250 μl dung dịch cần phân tích cho vào ống nghiệm, thêm vào 1,5 mL dung dịch A (dung dịch NaBH_4 nồng độ 0,9% trong sulfuric acid 98%), phản ứng được tiến hành ở 100°C trong 10 phút. Làm lạnh nhanh trong nước đá, sau đó thêm tiếp 50 μl dung dịch B (dung dịch carbazole 0,1% trong cồn 100%), lắc đều và cho đun cách thủy trong 15 phút. Làm lạnh nhanh phản ứng đến nhiệt độ phòng và tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng $\lambda = 525 \text{ nm}$.

2.2.4. Xác định khối lượng phân tử trung bình của glycosaminoglycan

Khối lượng phân tử trung bình của GAGs được xác định bằng kỹ thuật sắc ký thẩm thấu gel (GPC - Gel permeation chromatography) trên hệ thống sắc ký Shimadzu LC-20AD, đầu dò RID, cột GPC/SEC Suprema Ultrahigh $10\mu\text{m}$ (8 x 300 mm).

Cách tiến hành: mẫu GAGs được chuẩn bị trong nước deion và lọc qua màng $0,45 \mu\text{m}$ trước khi phân tích. Dung dịch Liti nitrate (LiNO_3) nồng độ 0,1M được sử dụng làm pha động. Tiến hành phân tích với tốc độ dòng 1 mL/phút, thời gian thực hiện là 50 phút ở nhiệt độ 40°C . Các dextran có trọng lượng phân tử khác nhau gồm 1000, 5000, 12000, 25000, 50000, 150000, 270000 và 670000 (Da) được sử dụng để dựng đường chuẩn.

2.2.5. Xác định đặc điểm cấu trúc của glycosaminoglycan sử dụng các phương pháp phổ gồm: phổ hồng ngoại (IR) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$)

2.2.5.1. Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của GAGs được ghi trên máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AVANCE III - 500 NMR

Spectrometer (Thủy Sĩ) đo tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu các phân đoạn GAGs được pha trong D₂O với nồng độ 20 µg/ml, đo ở tần số 75,5 MHz tại nhiệt độ 35⁰C.

2.2.5.2. Phương pháp phổ hồng ngoại IR

Phổ hồng ngoại IR được sử dụng để xác định các nhóm chức trong cấu trúc phân tử, cho biết sự có mặt của các nhóm chức trong các hợp chất. Do vậy ta có thể dựa vào đó để xác định thành phần hóa học GAGs bằng các tín hiệu, vùng phổ hấp thụ đặc trưng các nhóm chức. Hơn nữa vị trí liên kết các nhóm chức khác nhau cũng cho tín hiệu khác nhau. Ví dụ như GAGs có hàm lượng sulfate cao, các tín hiệu sẽ làm rõ vị trí thế của chúng trong các gốc đường ở vị trí axial hay equatorial (bảng 2.1).

Bảng 2.1. Các đỉnh phổ, vùng phổ đặc trưng của fucoidan xuất hiện trên phổ hồng ngoại (IR) [83] [84]

Đỉnh	Dao động
775	Dao động dẫn vòng của α - anomer
802-810	Dao động gấp của liên kết C-O-S của nhóm SO ₃ ở vị trí C2 hoặc C3 của gốc đường pyranose
822	Dao động gấp của liên kết C-O-S của nhóm SO ₃ ở vị trí equatorial
845	Dao động gấp của liên kết C-O-S của nhóm SO ₃ ở vị trí axial
847	Dao động của liên kết C1-H của α - anomer
893	Dao động của liên kết C1-H của β - anomer
917	Dao động vòng của α -anomer
1030-1167	Dao động hoá trị của hemiacetal
1034	Dao động hoá trị đối xứng của C-O-C

1255-1264	Dao động hoá trị của S=O
1420	Dao động hoá trị đối xứng của COO
1430	Dao động gấp của C-H
1730	Dao động hoá trị của C=O
3300-3440	Dao động hoá trị của O-H

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ CHIẾT TÁCH VÀ THU NHẬN GLYCOSAMINOGLYCAN TỪ HẢI SÂM *HOLOTHURIA LEUCOSPILOTA*

Glycosaminoglycan được chiết tách từ hải sâm *Holothuria leucospilota* theo phương pháp được mô tả ở mục 2.2.2.1, kết quả thu được hàm lượng GAGs ở dạng bột khô đạt 4,7 % so với khối lượng mẫu nguyên liệu chiết đầu vào. Kết quả này cho thấy hàm lượng GAGs thu được từ *H. leucospilota* thấp hơn so với hàm lượng GAGs thu nhận được từ một số loài hải sâm cùng chi *Holothuria* khác đã được công bố trước đây. Cụ thể như sau, Chen và cộng sự (năm 2011) đã công bố hàm lượng GAGs được chiết tách thu nhận từ loài hải sâm *Holothuria nobilis* đạt 8,3% [85], Sau đó, nhóm nghiên cứu của Omran và cộng sự (năm 2013) đã công bố hàm lượng GAGs từ hải sâm *Holothuria vagabunda* là 6,3 % [86]. Bên cạnh đó, kết quả công bố về hàm lượng GAGs được chiết tách từ một số loài hải sâm thuộc các chi khác cũng cho kết quả cao hơn so với kết quả trong nghiên cứu này như: *Stichopus japonicus* 4,8 % [87], *Isostichopus baddonotus* là 9,9% [88]. Tuy nhiên, hàm lượng GAGs thu nhận được từ *H. leucospilota* vẫn cao hơn hàm lượng GAGs thu nhận được từ hải sâm *Apostichopus japonicas* 1,7 % [36]. Các ví dụ về hàm lượng GAGs chiết tách được từ một số loài hải sâm được tổng hợp ở bảng 3.1 dưới đây.

Bảng 3.1. Hàm lượng GAGs được chiết tách từ *H. leucospilota* và một số loài hải sâm trên thế giới [36,85,86,87,88]

Hải sâm	Hàm lượng GAGs (%)*
<i>Holothuria leucospilota</i>	4,7
<i>Stichopus japonicus</i>	4,8 [87]
<i>Isostichopus baddonotus</i>	9,9 [88]
<i>Apostichopus japonicas</i>	1,7 [36]
<i>Holothuria nobilis</i>	8,3 [85]
<i>Holothuria vagabunda</i>	6,3 [86]

Như vậy, có thể thấy hàm lượng glycosaminoglycan có sự biến đổi theo loài, thậm chí có những loài trong cùng một chi cũng có sự khác nhau đáng kể về hàm lượng GAGs thu nhận được [85], [86]. Sự biến đổi về hàm lượng GAGs giữa các loài hải sâm rất khó để có thể đưa ra những đánh giá mang tính khái quát. Tuy nhiên, sự khác biệt về hàm lượng GAGs giữa các loài hải sâm có thể được lý giải bởi sự ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố như: giai đoạn sinh trưởng của loài khi được thu thập nghiên cứu, điều kiện môi trường sống, cấu tạo sinh học của mỗi loài cũng khác nhau. Ngoài ra, các kỹ thuật chiết tách áp dụng cho mỗi nghiên cứu cũng có những ảnh hưởng đáng kể đến kết quả thu nhận GAGs [36], [87], [88].

Các kết quả nghiên cứu trước đây về GAGs đều chỉ ra rằng, GAGs thuộc nhóm polymer có cấu trúc phức tạp, tương tự như các polysaccharide từ rong biển [67-79], GAGs có cấu tạo bao gồm nhiều monomer khác nhau, trong đó các gốc đường chính gồm: Glucuronic acid, NAcetyl-Galactosamin và Fucose với các hàm lượng khác nhau, ngoài ra còn có thể có thêm một số gốc đường đơn khác với hàm lượng nhỏ hơn như: glucose, galactose, ... [85-88]. Mỗi loài hải sâm đều chứa các nhóm GAGs có cấu trúc đặc trưng duy nhất, sự khác nhau về thành phần đường, cũng như kiểu liên kết cấu trúc giữa các gốc đường tạo nên sự đa dạng về cấu trúc của GAGs hải sâm. Mặc dù vậy, nhiều nghiên cứu đều chỉ ra rằng GAGs thường được chia ra thành 2 nhóm cấu trúc chính là nhóm Fucan sulfated (FS) và nhóm Fucosylated Chondroitin Sulfate (FCS). Mỗi loài hải sâm có thể chứa từ một tới nhiều dạng cấu trúc FS và FCS khác nhau [69]. Như vậy, để tiếp tục đánh giá về đặc trưng cấu trúc của GAGs từ hải sâm *H. leucospilota* chúng tôi sẽ tiến hành phân tích một số thành phần hóa học chính của GAGs trước khi tiến hành tách phân đoạn để phục vụ cho nghiên cứu đánh giá chi tiết hơn về đặc trưng cấu trúc của GAGs.

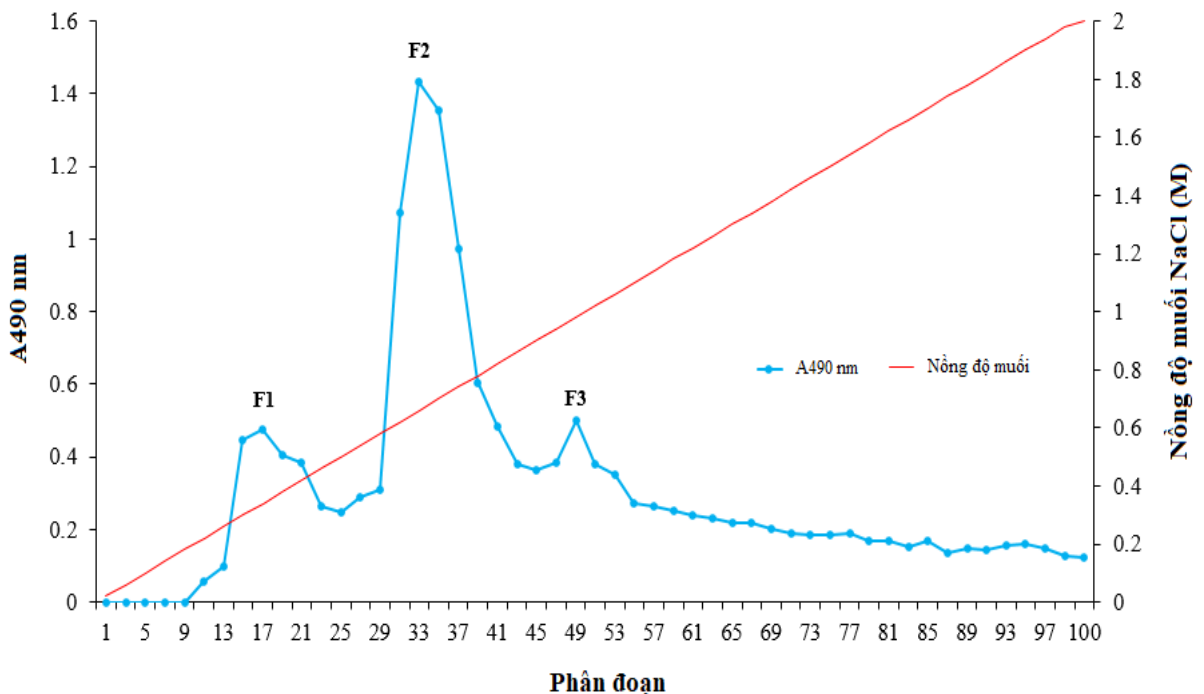
3.2. KẾT QUẢ TÁCH PHÂN ĐOẠN GLYCOSAMINOGLYCAN

Trước khi tiến hành tách phân đoạn, tinh chế GAGs được tiến hành phân tích một số thành phần hóa học chính như hàm lượng đường tổng số, hàm lượng sulfate và uronic acid. Việc đánh giá các chỉ tiêu trên sẽ giúp xác định thông tin sơ bộ về thành phần của mẫu chiết tổng ban đầu, cũng như mức độ nhiễm tạp chất khác (nếu có). Kết quả phân tích được chỉ ra trong bảng 3.2, hàm lượng tổng carbohydrate chiếm 36,61%; hàm lượng sulfate và uronic acid lần lượt là

26,59 và 22,30%. So với mẫu GAGs từ hải sâm *Apostichopus japonicus* được công bố trước đây bởi Liu và cộng sự, hàm lượng tổng carbohydrate chiếm 64,21%, trong khi hàm lượng sulfate chỉ chiếm 15,74% [89]. Bên cạnh đó hàm lượng sulfate cũng cao hơn nhiều so với các mẫu GAGs từ một số loài hải sâm khác trên thế giới đã được công bố như *Ludwigothurea grisea* (13,9%), *Isosticopus badionotus* (22,1%), *Brandthorurea arenicola* (18,2%) [3] và tương đương với hàm lượng sulfate của các mẫu PS từ loài hải sâm *Cucumaria japonica* 28,5% [2]. Theo các nghiên cứu trước đó về mối quan hệ giữa hoạt tính sinh học với các đặc trưng cấu trúc của GAGs hải sâm đã chứng minh rằng mật độ nhóm sulfate đóng vai trò quan trọng nhất quyết định đến các hoạt tính sinh học của nhóm hợp chất polymer sinh học này [90]. Ngoài ra các kết quả phân tích trong bảng 3.2 còn cho thấy sự có mặt của protein với hàm lượng 8,08%, kết quả tương tự cũng đã được chỉ ra trong công bố của Liu và cộng sự khi nghiên cứu thành phần hóa học của GAGs được phân lập từ hải sâm *A. japonicus* hàm lượng protein chiếm 15,74% [89]. Các nghiên cứu đã được công bố về thành phần hóa học và đặc điểm cấu trúc của polysaccharide sulfate từ sinh vật biển nói chung và hải sâm nói riêng, đã chứng minh rằng chúng thuộc nhóm polymer dị thể có cấu trúc hết sức phức tạp. Các polymer này được tạo nên bởi nhiều gốc đường khác nhau và cả nhóm sulfate [1], [36], [85], [91]. Kết quả phân tích thành phần đường đơn của mẫu GAGs trong bảng 3.2 cũng cho thấy sự phù hợp với các nghiên cứu đã được công bố trên thế giới, GAGs có chứa đồng thời cả 4 gốc đường với các tỉ lệ mol khác nhau là Fucose (Fuc), Glucuronic acid (GlcA), Nacetyl-Galactosamin (GalNAc) và Galactose (Gal), trong đó gốc đường Fuc chiếm tỉ lệ lớn nhất, tỉ lệ nhỏ nhất là gốc đường Gal. Các kết quả này cũng tương tự như thành phần của PS từ các loài hải sâm như *Thelenata ananas* [92], *Apostichopus japonicus*, *Actinopyga mauritiana* [36], *Acaudina molpadioidea*, *Holothuria nobilis* [1], trái lại thành phần đường đơn của GAGs từ các loài hải sâm *Ludwigothurea grisea*, *Isosticopus badionotus* và *Brandthorurea arenicola* chỉ có Fuc là thành phần chính, hai gốc đường GlcA và GalNAc chỉ chiếm một lượng rất nhỏ [3]. Tóm lại, thành phần monosaccharide của glycosaminoglycan từ hải sâm phần lớn đều có đặc điểm chung là có thành phần được tạo nên chủ yếu bởi các gốc Fuc, GalNAc và GlcA, cùng với một lượng nhỏ các gốc đường khác như GlcNAc, Gal, Glc. Tuy nhiên, mỗi loài hải sâm đều có sự khác biệt về hàm lượng và thành phần các

gốc đường. Sự biến đổi về thành phần đường không chỉ được phát hiện trong các loài hải sâm khác nhau mà với cùng một chi hay thậm chí là cùng loài được thu ở những vùng địa lý khác nhau [90]. Vì vậy, có thể thấy các GAGs hải sâm tương đối phức tạp về thành phần cũng như đặc điểm cấu trúc. Do đó, để nghiên cứu đặc trưng cấu trúc của các glycosaminoglycan hải sâm, các bước tách phân đoạn tinh chế sẽ tiếp tục được thực hiện nhằm làm đơn giản hóa việc phân tích cấu trúc của chúng.

GAGs được tách phân đoạn bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi anion trên cột DEAE-Macro Prep. GAGs có bản chất là các anion polysaccharide với gốc mang điện tích là các nhóm ($-\text{SO}_3^-$), dựa trên cơ chế trao đổi điện tích với nhóm ion dương của pha tĩnh cột sắc ký, GAGs sẽ được giữ lại trên cột sau khi nạp mẫu. Khi sử dụng dung môi rửa giải là NaCl theo gradient tăng dần nồng độ để rửa giải, khi đó các phân đoạn GAGs có mật độ nhóm sulfate thấp (nhóm mang điện tích) sẽ được rửa giải ra trước, các phân đoạn GAGs có mật độ nhóm sulfate cao được rửa giải ra sau. Kết quả tách phân đoạn của các mẫu GAGs *H. leucopilota* thu được như trên hình 3.1



Hình 3. 1. Phân đoạn GAGs bằng sắc ký trao đổi anion

Trên hình 3.1 ta thấy xuất hiện 03 đỉnh sắc ký, tương đương với 03 phân đoạn (F1, F2 và F3) được rửa giải khỏi cột sắc ký ở các nồng độ muối NaCl khác nhau. Từ kết quả tách phân đoạn này có thể đưa ra dự đoán mỗi phân đoạn

của glycosaminoglycan *H. leucospilota* sẽ có các đặc trưng cấu trúc khác nhau, phân đoạn F2 thu nhận được có hàm lượng cao gấp 3 lần so với 02 phân đoạn F1 và F3, các phân đoạn này được thu nhận ở các nồng độ rửa giải là F1 (0,5N NaCl), F2 (0,75N NaCl) và F3 (1N NaCl). Các nghiên cứu trước đây về glycosaminoglycan từ hải sâm ở Việt Nam cũng cho kết quả tương tự về số lượng các phân đoạn glycosaminoglycan thu nhận được khi tách phân đoạn bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi ion. Glycosaminoglycan được phân lập từ hải sâm *Stichopus variegatus* và *Bohadschia argus* đều có chứa 03 phân đoạn khi tiến hành tách phân đoạn, kết quả phân tích về thành phần hóa học và cấu trúc của các phân đoạn này đã cho thấy có 2 kiểu cấu trúc được phát hiện là Fucan sulfate và Fucosylated chondroitin sulfate [36], [48]. Một số kết quả tương tự cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đây như: GAGs ở hải sâm *H. edulis* [73] cũng thu được 03 phân đoạn GAGs với F2 chiếm lượng lớn hơn so với F3 và F1, hàm lượng F3 cao hơn ở F1. Phân đoạn F2 thường được rửa giải ở khoảng nồng độ 0,75N NaCl. Tuy nhiên, trong một vài nghiên cứu chỉ thu nhận được 02 phân đoạn GAGs khi nghiên cứu trên các loài hải sâm *Stichopus horrens* [76], *H. atra* [75], các phân đoạn GAGs từ 02 loài hải sâm này đều có chứa 02 nhóm FS và FCS. Trước đó, nhóm tác giả Mourão và cộng sự cũng đã nghiên cứu chiết tách được hai phân đoạn fucosylate chondroitin sulfate và fucan sulfate từ hải sâm *Ludwigothurea grisea* [3]. Các nghiên cứu sau này về GAGs hải sâm cũng đều thu nhận được hai nhóm polysaccharide sulfate là fucosylated chondroitin sulfate (FCS) và fucan sulfate (FS) [90]. Tuy nhiên, thành phần và cấu trúc của FCS và FS từ mỗi loài hải sâm là khác nhau, thậm chí trong cùng một chi hay một loài cũng không giống nhau [4]. Như vậy, thành phần hóa học của mỗi phân đoạn GAGs hải sâm thu được ở trên sẽ tiếp tục được nghiên cứu thêm nhằm làm rõ hơn về đặc điểm cấu trúc của mỗi phân đoạn thu nhận được. Kết quả phân tích thành phần hóa học của các phân đoạn được đưa ra trong bảng 3.2, trong đó thành phần monosaccharide được phân tích bằng phương pháp HPLC sau khi được thủy phân trong thời gian 8 giờ ở

100°C bằng dung dịch TFA 2N (triflorua acetic acid), hàm lượng sulfate được phân tích bằng phương pháp đo độ đục với BaCl₂/gelatin và hàm lượng uronic acid được phân tích bằng phương pháp Carbazone.

3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÁC PHÂN ĐOẠN GLYCOSAMINOGLYCAN

Kết quả phân tích một số thành phần hóa học chính của GAGs và các phân đoạn thu nhận được từ hải sâm *Holothuria leucospilota* được đưa ra trong bảng 3.2 dưới đây.

Bảng 3.2. Thành phần hóa học của GAGs và các phân đoạn từ hải sâm *Holothuria leucospilota*

Mẫu	Tổng carbohydrate %	Ti lệ mol				Sulfate ***%	Uronic acid ***%	Protein ***%
		Fuc	GalNAc	GlcA	Gal			
GAGs*	36,61	2,21	0,90	1,00	0,72	26,59	22,30	8,08
F1**	37,30	1,89	1,54	1,00	0,68	7,92	6,48	0,51
F2**	38,08	2,55	1,62	1,00	0,43	23,10	12,60	-
F3**	45,82	1	-	-	-	32,84	-	-

Trong đó: *% tính theo trọng lượng nguyên liệu hải sâm khô, **% tính theo trọng lượng mẫu dùng để tách phân đoạn và ***% tính theo trọng lượng mẫu GAGs

Kết quả phân tích hàm lượng đường tổng số của mẫu GAGs thô và các mẫu phân đoạn F1, F2 và F3 trong bảng 3.2 cho thấy hàm lượng tổng carbohydrate của phân đoạn GAGs thô và 02 phân đoạn F1, F2 khác nhau không đáng kể, dao động trong khoảng 36,61 – 38,08 %, trong khi đó phân đoạn F3 có hàm lượng tổng carbohydrate là 45,82% cao hơn đáng kể so với 02 phân đoạn F1, F2 và mẫu GAGs thô.

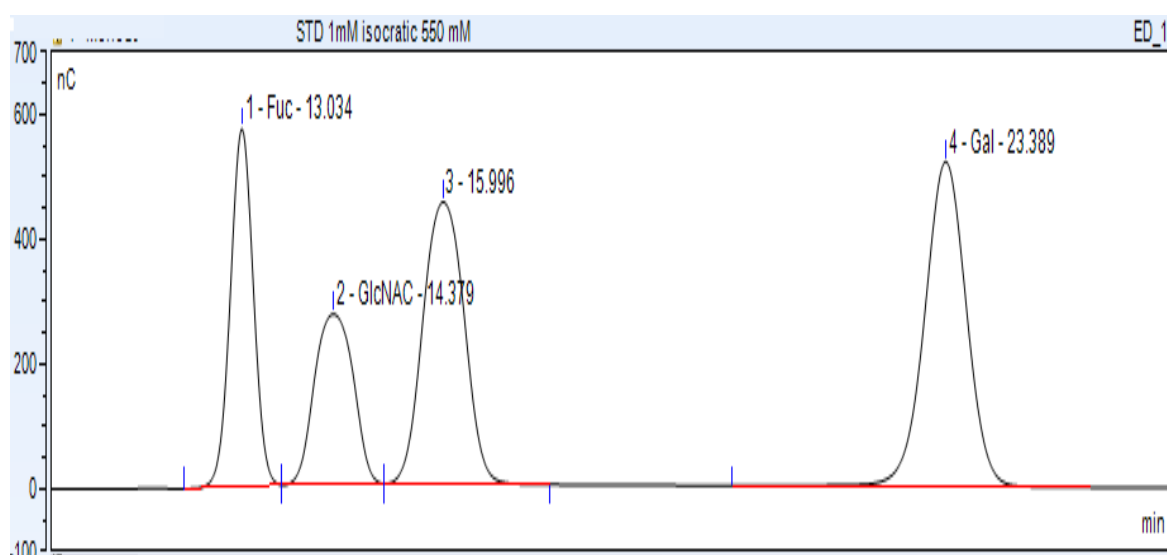
Kết quả phân tích hàm lượng sulfate (bảng 3.2) cho thấy, hàm lượng sulfate của mẫu GAGs thô và các mẫu phân đoạn nằm trong khoảng từ 7,92 – 32,84%, hàm lượng thấp nhất 7,92% thuộc về phân đoạn F1, phân đoạn F3 có hàm lượng sulfate cao nhất 32,84%, trong khi đó hàm lượng sulfate của phân

đoạn còn lại F2 là 23,10%. Như vậy, có thể thấy hàm lượng sulfate của mẫu GAGs thô cao hơn so với 02 phân đoạn F1, F2, nhưng nhỏ hơn hàm lượng sulfate của phân đoạn F3, các kết quả nghiên cứu tương tự cũng đã được chỉ ra trong một số nghiên cứu trước đây [36], [48], [55], [85]. Chúng ta cũng có thể nhận thấy hàm lượng sulfate tăng dần từ phân đoạn F1 đến phân đoạn F3, kết quả này có thể được giải thích là khi tiến hành rửa giải các phân đoạn theo gradient tăng dần nồng độ dung dịch muối NaCl, phân đoạn có mật độ nhóm mang điện nhỏ hơn thì lực liên kết với pha tĩnh trong cột sắc ký nhỏ hơn và do đó sẽ được rửa giải ra khỏi cột sắc ký với nồng độ dung dịch chất rửa giải thấp hơn. Phân đoạn F1 được rửa giải ở nồng độ 0,5N NaCl, trong khi đó phân đoạn F2 và F3 được rửa giải ở các nồng độ tương ứng là 0,75N và 1,0 N NaCl. Hàm lượng sulfate của mẫu GAGs và các phân đoạn F2, F3 cho thấy cao hơn nhiều so với các mẫu glycosaminoglycan từ một số loài hải sâm khác trên thế giới đã được công bố như *Ludwigothurea grisea* (13,9%), *Isosticopus badionotus* (22,1%), *Brandthorurea arenicola* (18,2%) [3] và tương đương với hàm lượng sulfate của các mẫu GAGs từ các loài hải sâm *Actinopyga mauritiana* 33%, *Cucumaria japonica* 28,5% [36] Ngoài yếu tố nhóm mang điện tích ảnh hưởng đến các nhóm tín hiệu thu được khi tách phân đoạn bằng sắc ký trao đổi ion, thì các yếu tố về đặc trưng cấu trúc như kiểu cấu trúc mạch nhánh hay mạch thẳng cũng liên quan đến sự hình thành các peak tín hiệu trên sắc ký đồ trao đổi ion (hình 3.1). Do đó, mỗi peak tín hiệu (mỗi phân đoạn thu nhận) sẽ tương ứng với một nhóm hợp chất có sự tương đồng nhất về mặt cấu trúc như mật độ nhóm sulfate, kiểu cấu trúc mạch nhánh hay mạch thẳng, tỉ lệ thành phần các gốc đường cấu tạo nên,... Vì vậy kết quả phân tích thành phần hóa học của mỗi phân đoạn cho ta thấy hoàn toàn khác nhau [1]. Theo các nghiên cứu trước đó về mối quan hệ giữa hoạt tính sinh học với các đặc trưng cấu trúc của GAGs hải sâm đã chứng minh rằng mật độ nhóm sulfate đóng vai trò quan trọng nhất quyết định đến các hoạt tính sinh học của nhóm hợp chất polymer sinh học này [90]. Ngoài ra các kết quả phân tích trong bảng 3.2 còn cho thấy sự có mặt của

protein với hàm lượng từ 8,08% trong mẫu GAGs và 0,51% trong phân đoạn F1, hai phân đoạn F2 và F3 không phát hiện thấy sự có mặt của protein, kết quả tương tự cũng đã được chỉ ra trong công bố của Liu và cộng sự khi nghiên cứu thành phần hóa học của GAGs được phân lập từ hải sâm *A. japonicus* hàm lượng protein chiếm 15,74% [89]. Kết quả này cho thấy sau khi tách phân đoạn bằng sắc ký trao đổi anion đã loại bỏ được protein khỏi mẫu GAGs thô ban đầu, kết quả này có thể được giải thích do sự tương tác giữa các phân tử protein với nhựa DEAE- Macroprep yếu hơn so với các phân đoạn của glycosaminoglycan, nên có thể đã được rửa giải ra khỏi cột ở bước đầu tiên khi chạy cân bằng cột sau khi đưa mẫu lên cột tách và ở các nồng độ thấp hơn của muối NaCl.

Uronic acid chỉ được phát hiện thấy trong 02 phân đoạn F1 và F2 với hàm lượng lần lượt là 6,48 và 12,60% thấp hơn so với mẫu GAGs. Uronic acid được cho là thành phần đại diện của galacturonic acid và/hoặc glucuronic acid [3]. Hàm lượng uronic acid được chứng minh có mặt trong tất cả các phân đoạn dạng fucosylated chondroitin sulfate của hải sâm, tuy nhiên hàm lượng của đại lượng này cũng biến đổi phụ thuộc vào loài và cả các phân đoạn được phân lập trong cùng một loài [4]. Cụ thể như hàm lượng uronic acid trong các phân đoạn được thu nhận bằng sắc ký trao đổi ion trên cột DEAE-Sephacel của polysaccharide sulfate từ hải sâm *Cucumaria japonica* được xác định thay đổi nằm trong khoảng 1,4-14,8% [36]. Các glycosaminoglycan hải sâm thuộc nhóm polymer dị thể được tạo nên bởi các gốc đường đơn khác nhau và các nhóm chức năng (sulfate và uronic acid). Các nghiên cứu trước đây đều chỉ ra rằng, tất cả glycosaminoglycan hải sâm đều có chứa 03 gốc đường chính là Fucose, Glucuronic acid và Nacetyl-Galactosamin, bên cạnh đó còn chứa một lượng nhỏ các gốc đường khác như glucose, galactose, ... [4], [36], [43], [46], [52]. Thành phần đường đơn của mẫu GAGs và các phân đoạn trong bảng 3.2 cũng chỉ ra kết quả tương tự như các nghiên cứu về thành phần đường đơn của GAGs hải sâm trong các nghiên cứu đã công bố trước đây [4], [52].

Ở mẫu GAGs 4 thành phần đường đã được xác nhận bao gồm: Fucose (Fuc), N-Acetyl Galactosamine (GalNAc), Glucuronic acid (GlcA) và Galactose (Gal) (Hình 3.2). Tỷ lệ các thành phần Fuc, GalNAc, GlcA, Gal là 2,21: 0,9: 1: 0,72 (bảng 3.2), Fuc chiếm hàm lượng cao nhất trong số các gốc đường, 02 gốc đường GalNAc và GlcA có tỷ lệ khác nhau không nhiều và một lượng nhỏ hơn gốc đường Gal. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu về GAGs từ các loài hải sâm *Ludwigothurea grisea* [3], *Isosticopus badionotus* [42], *Apostichopus japonicus*, *Actinoyaga mauritiana* [36], *Holothuria nobilis* [85] đều có chứa các gốc đường kể trên bên cạnh một lượng nhỏ gốc đường Glucose.



Hình 3.2. Thành phần đường đơn của GAG thô từ hải sâm *H. leucospilota* trên máy phân tích HPLC ICS-6000

Thành phần các gốc đường của 02 phân đoạn F1 và F2 cũng tương tự như trong mẫu GAGs, nhưng có sự khác nhau về tỷ lệ giữa các gốc đường. Thành phần đường trong phân đoạn F1 là Fuc : GalNAc : GlcA : Gal = 1,89 : 1,54 : 1,0 : 0,68 (bảng 3.2), phân đoạn F2 có chứa các gốc đường với tỷ lệ như sau Fuc : GalNAc : GlcA : Gal = 2,55 : 1,62 : 1,0 : 0,43 (bảng 3.2). Gốc Fuc vẫn chiếm tỷ lệ lớn nhất trong số các gốc đường, ngược lại gốc GalNAc chiếm tỷ lệ lớn hơn gốc GlcA trong 2 phân đoạn F1, F2 so với mẫu GAGs, gốc đường còn lại Gal chiếm tỷ lệ nhỏ dần từ phân đoạn F1 tới F2. Kết quả này cũng cho thấy

sự tương đồng so với các kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học của fucosylated chondroitin sulfate từ các loài hải sâm khác trên thế giới đã được công bố [3], [36], [85], [87], [91].

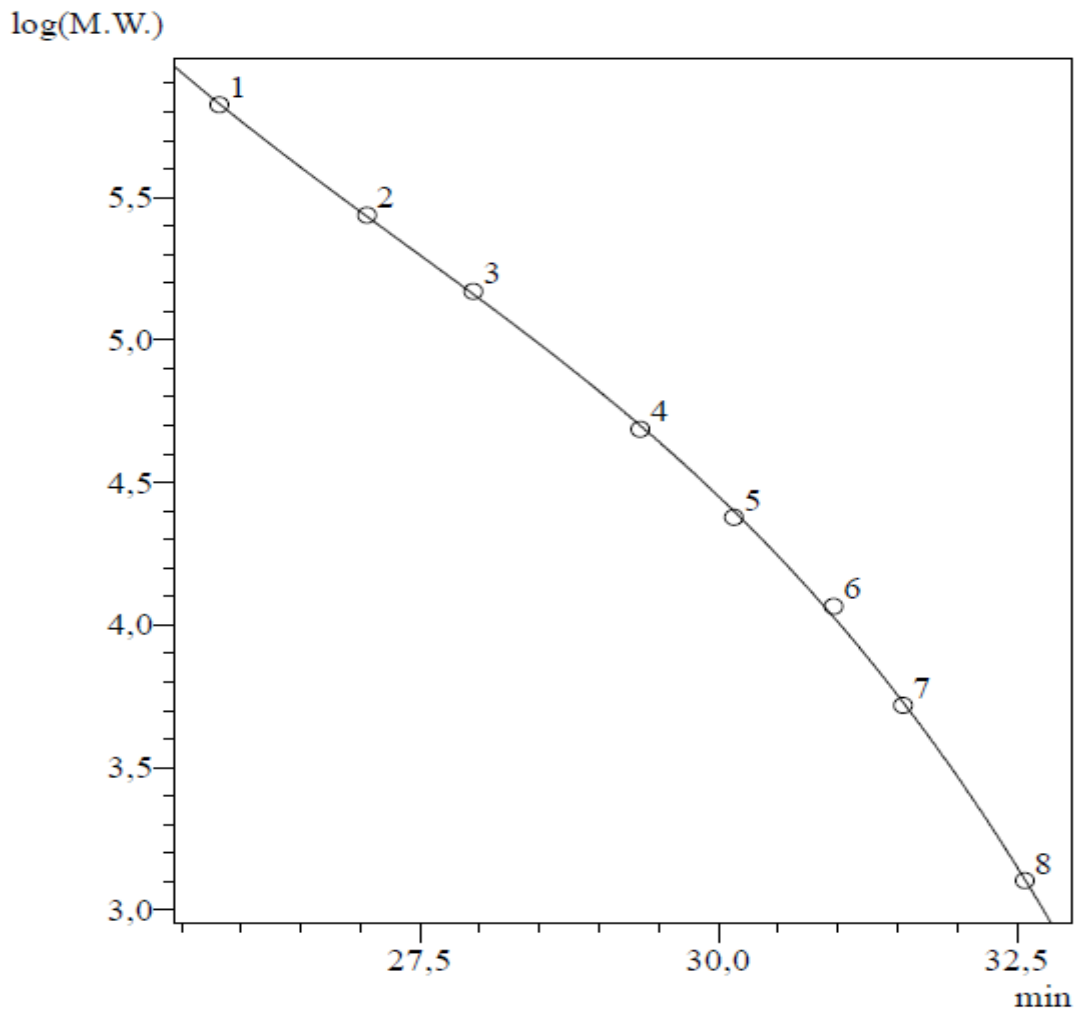
Trong khi đó, ở phân đoạn F3 chỉ thấy xuất hiện một gốc đường duy nhất là Fuc. Như vậy, có thể thấy phân đoạn F3 có thành phần hóa học rất khác biệt so với 2 phân đoạn F1 và F2. Phân đoạn F3 với đặc điểm chỉ chứa gốc Fuc và sulfate được xếp vào nhóm Fucan sulfate (FS). Từ kết quả xác định các thành phần hóa học của 03 phân đoạn GAGs hải sâm *H. leucospilota*, so với các nghiên cứu đã công bố trước đây trên thế giới, có thể dự đoán cả 2 phân đoạn F1, F2 đều thuộc nhóm fucosylated chondroitin sulfate khi có chứa đồng thời các gốc đường Fucose, N-Acetyl Galactosamine và Glucuronic acid. Trong khi đó F3 thuộc nhóm Fucan sulfate do chỉ chứa gốc Fucose cùng các nhóm sulfate [2], [4], [36], [42], [48], [56].

Kết luận: Kết quả tách phân đoạn bằng sắc ký trao đổi ion trên cột DEAE-Macro Prep, cũng như kết quả phân tích thành phần hóa học của các phân đoạn glycosaminoglycan từ hải sâm *H. Leucospilota* cho thấy có 02 nhóm cấu trúc dạng fucan sulfate và fucosylated chondroitin sulfate đều được phát hiện thấy có mặt trong loài hải sâm này, 02 phân đoạn (F1, F2) thuộc nhóm fucosylated chondroitin sulfate khác nhau do các thành phần hóa học khác nhau. Các phân đoạn FS và FCS của mỗi loài hải sâm đều không giống nhau ít nhất là về mặt thành phần hóa học (như tỉ lệ giữa các gốc đường, hàm lượng sulfate, uronic acid), trong đó các phân đoạn FCS trong cùng một loài cũng không giống nhau cũng đã được chỉ ra trong nhiều kết quả trước đây [4], [52], [55], [57]. Kết quả này chỉ ra sự phức tạp về cấu trúc của glycosaminoglycan hải sâm. Tuy nhiên chính sự đa dạng về cấu trúc lại mang đến sự lợi ích thú vị về hoạt tính sinh học của nhóm polymer này. Vì vậy, để có thể sử dụng một cách hiệu quả vào việc tăng cường sức khỏe con người cũng như các lợi ích về mặt điều trị bệnh của GAGs hải sâm thì việc nghiên cứu chi tiết đặc điểm cấu trúc của chúng là hết sức cần thiết.

3.4. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH TRỌNG LƯỢNG PHÂN TỬ CỦA GLYCOSAMINOGLYCAN

Mẫu GAGs từ hải sâm *H. leucospilota* được tiến hành đo xác định khối lượng phân tử bằng kỹ thuật sắc ký thẩm thấu gel GPC (Gel Permeation Chromatography). Phương pháp này còn giúp đánh giá mức độ nhiễm tạp các hợp chất không mong muốn khác trong quá trình chiết tách GAGs từ hải sâm. Các dextran có trọng lượng phân tử khác nhau từ 1.000, 5.000, 12.000, 25.000, 50.000, 150.000, 270.000 và 670.000 (Da) được sử dụng để dựng đường chuẩn. Đồ thị đường chuẩn được thể hiện ở hình 3.3. Kết quả sắc ký đồ xác định trọng lượng phân tử của glycosaminoglycan *Holothuria leucospilota* được trình bày trên các hình 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 tương ứng với mẫu thô và các mẫu phân đoạn F1, F2, F3 nhằm đánh giá chi tiết hơn mỗi phân đoạn.

3.4.1 Phương trình đường chuẩn dextran



Hình 3. 3. Đồ thị đường chuẩn Dextran

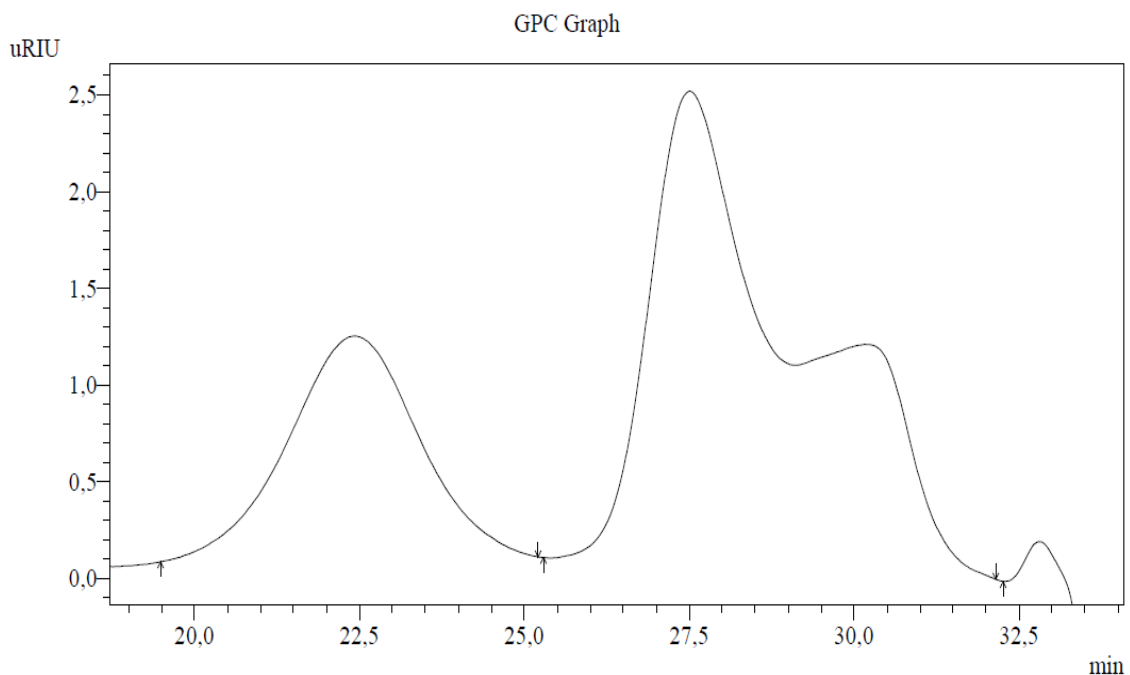
Từ các dextran chuẩn, sau khi chạy trên sắc ký thẩm thấu gel GPC ta xây dựng được đồ thị đường chuẩn như hình trên. Sau đó tính toán thì thu được phương trình đường chuẩn dùng để xác định trọng lượng phân tử các phân đoạn GAGs.

Phương trình đường chuẩn:

$$f(X) = -0,004627441 * X^3 + 0,3801614 * X^2 - 10,71567 * X + 108,7171$$

$$R^2 = 0,9996146$$

3.4.2 Trọng lượng phân tử GAGs thô



Hình 3. 4. Sắc ký đồ GPC của GAGs được phân lập từ *H. leucospilota*

Bảng 3.3. Kết quả xác định trọng lượng phân tử GAGs thô

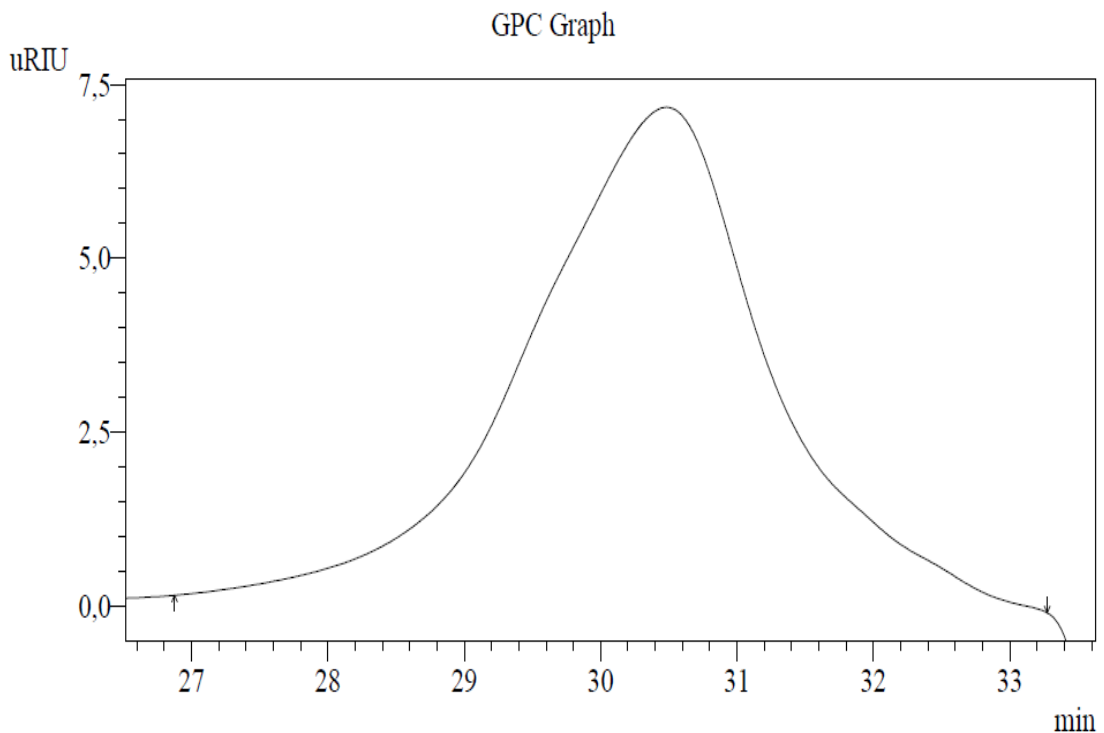
Mẫu		Mn (g/mol)	Mw (Da)	Mw/Mn
GAGs thô	Peak 1	13744783	112123909	8,15
	Peak 2	48729	136.299	2,79
	Peak 3	749	846	1,13

Kết quả sắc ký đồ hình 3.3 cho thấy sự phân bố trọng lượng phân tử của GAGs thô hải sâm *H. leucospilota* tập trung chủ yếu ở peak số 1. Trọng lượng

phân tử trung bình (M_w) của các phân tử ở peak này được xác định là khoảng 112124 kDa, số trọng lượng phân tử trung bình (M_n) là 13744783, chỉ số PDI (Polydispersity Index) là 8,15.

Những nghiên cứu về GAGs ở nhiều loài hải sâm cho thấy hợp chất này có trọng lượng phân tử tương đối lớn, từ vài chục kDa (GAGs dạng FCS như các loài *Holothuria edulis*: 51,09 kDa, *Apostichopus japonicas*: 56,82 kDa, *Stichopus hermanni*: 64 kDa) đến vài trăm kDa như ở các loài *H. edulis*: 615,50 kDa, *Apostichopus japonicas*: 419,90 kDa, *Holothuria nobilis*: 475,80 kDa...). Hơn nữa, trọng lượng phân tử GAGs cũng khác nhau giữa các loài và giữa các phân đoạn GAGs trong cùng một loài [91] [92]. Tiếp theo là phân tích khối lượng phân tử trung bình từng phân đoạn nhằm đánh giá mức độ nhiễm tạp chi tiết hơn.

3.4.3. Khối lượng phân tử trung bình của phân đoạn F1-GAGs



Hình 3. 5. Sắc kí đồ GPC của phân đoạn F1-GAGs từ *H. leucopilota*

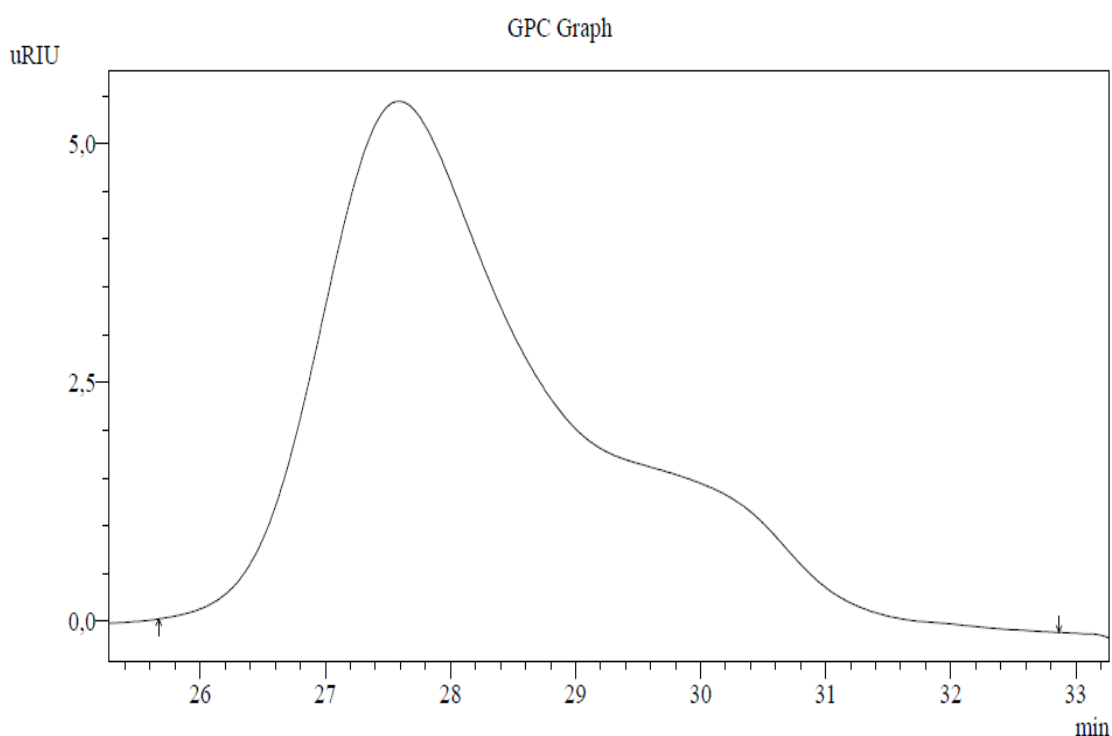
Bảng 3.4. Kết quả xác định khối lượng phân tử phân đoạn F1-GAGs

Mẫu		M_n (g/mol)	M_w (Da)	M_w/M_n
GAGs F1	Peak 1	11011	28.665	2,6

Kết quả cho thấy khối lượng phân tử trung bình (M_w) của các phân tử ở peak này được xác định là khoảng 28665 Da, số trọng lượng phân tử trung bình (M_n) là 11011, chỉ số PDI (Polydispersity Index) là 2,6.

Độ phân tán khối lượng ở giai đoạn F1 tương đối thấp, trong sắc kí đồ chỉ chứa một peak, điều đó chứng tỏ phân đoạn F1 được tinh sạch tốt, ít lẫn tạp chất khác. Do đó khi phân tích các thành phần cấu tạo, cấu trúc mạch liên kết cũng cho kết quả tin cậy, ít bị tín hiệu nhiễu hơn.

3.4.4. Khối lượng phân tử trung bình của phân đoạn F2-GAGs



Hình 3. 6. Sắc kí đồ GPC của phân đoạn F2-GAGs từ *H. leucospilota*

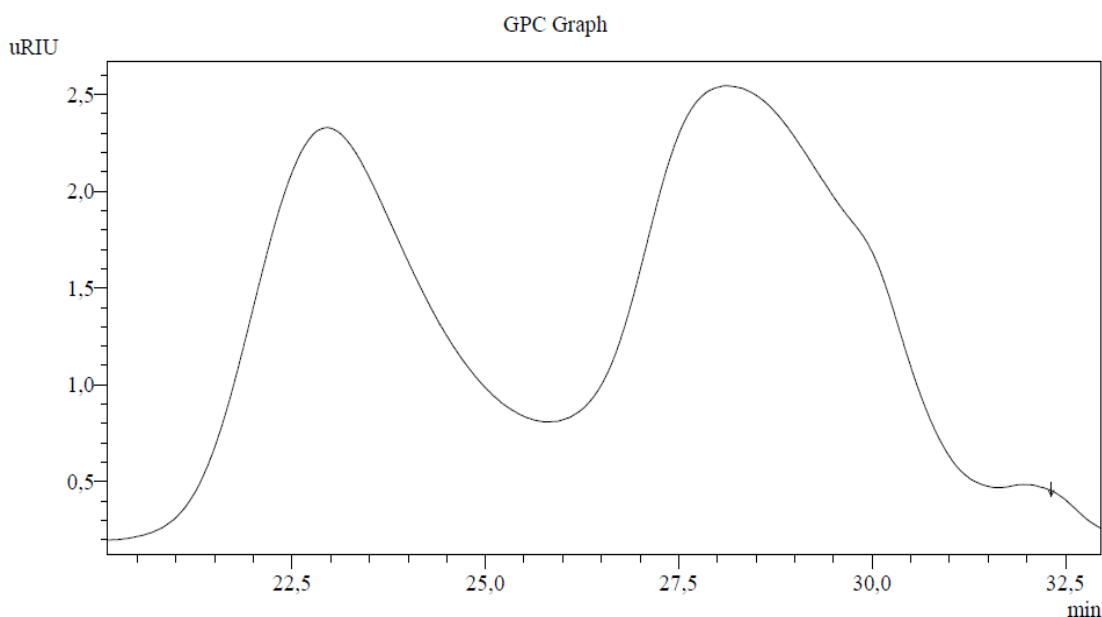
Bảng 3.5. Kết quả xác định khối lượng phân tử phân đoạn F2-GAGs

Mẫu		M_n (g/mol)	M_w (Da)	M_w/M_n
F2-GAGs	Peak 1	61418	149.093	2,42

Kết quả cho thấy khối lượng phân tử trung bình (M_w) của các phân tử ở peak này được xác định là khoảng 149.093 Da, số trọng lượng phân tử trung bình (M_n) là 61418, chỉ số PDI (Polydispersity Index) là 2,42.

Phân đoạn F2 cũng được tinh sạch tương đối tốt tương tự phân đoạn F1. Tuy nhiên giai đoạn này số trọng lượng phân tử trung bình cao hơn nhiều so với F1. Tỷ lệ này đạt xấp xỉ gấp 6 lần, điều này có thể là do lượng GAGs có cấu trúc tương đồng nhau được rửa giải ở nồng độ muối 0,52M đến 0,9M chiếm phần lớn trong GAGs thô.

3.4.5 Khối lượng phân tử trung bình của phân đoạn F3-GAGs



Hình 3.7. Sắc kí đồ GPC của phân đoạn F3-GAGs từ *H. leucospilota*

Bảng 3.6. Kết quả xác định khối lượng phân tử trung bình F3-GAGs

Mẫu		Mn (g/mol)	Mw (Da)	Mw/Mn
F3-GAGs	Peak 1	3482940	22275267	6,39
	Peak 2	84223	136.191	2,51

Trên sắc kí đồ phân đoạn này xuất hiện 2 đỉnh peak. Peak 1 cho thấy khối lượng phân tử trung bình (Mw) của các phân tử ở peak này được xác định là khoảng 22275267 Da, số trọng lượng phân tử trung bình (Mn) là 3482940, chỉ số PDI (Polydispersity Index) là 6,39. Ở peak 2 thì khối lượng phân tử trung bình (Mw) là 136.191 Da, số trọng lượng phân tử trung bình (Mn) là 84223, chỉ số PDI nằm ở 2,5. Như vậy, đây là phân đoạn có thể chứa tạp chất, Peak 1

với chỉ số PDI cao cùng khối lượng phân tử lớn khó xác định chính xác đặc điểm cấu trúc cũng như thành phần hóa học.

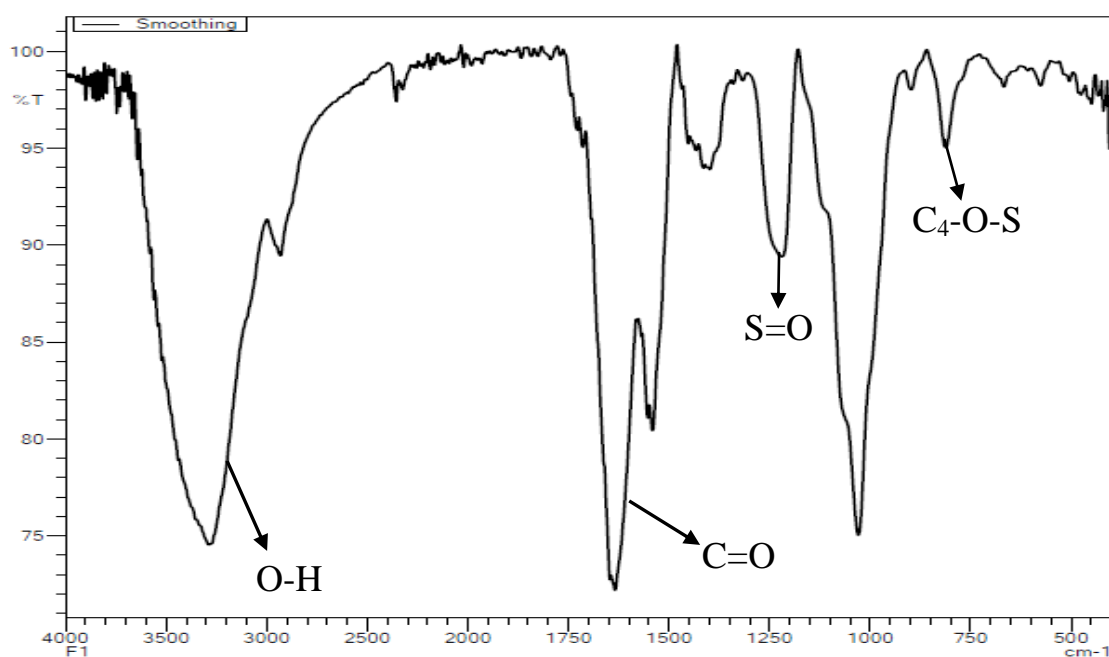
Như vậy thành phần hóa học các phân đoạn đã được làm rõ, bên cạnh đó khối lượng phân tử trung bình cũng đã đánh giá hiệu quả chiết tách tương đối cao, khối lượng phân tử phân bố tập trung, độ phân tán không nhiều, các phân đoạn được tinh sạch tương đối để tiến hành phân tích tiếp theo về xác định cấu trúc phân tử. Các liên kết trong mạch, vị trí mạch nhánh, vị trí các nhóm thế sulfate cùng kiểu liên kết sẽ được làm rõ qua các phân tích trên phổ hồng ngoại IR và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR.

3.5. XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC CỦA GLYCOSAMINOGLYCAN TỪ HẢI SÂM *H. LEUCOSPILOTA*

3.5.1. Phổ hồng ngoại IR

Phương pháp phổ hồng ngoại là phương pháp đơn giản và thuận tiện để nghiên cứu cấu trúc phân tử thông qua việc sắp xếp các vạch phổ dao động tương ứng với nhóm nguyên tử nhất định trong phân tử. Trong phân tích cấu trúc của polysaccharide sulfate nói chung và glycosaminoglycan nói riêng, phổ IR cho biết các thông tin về sự có mặt và vị trí nhóm sulfate, các liên kết glycoside tồn tại trong phân tử GAGs, từ đó cho biết một phần thông tin về đặc trưng cấu trúc của chúng. Theo tài liệu tham khảo [85], [87] các dao động hấp thụ ở vùng số sóng $820-830\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho liên kết C-O-S ở vị trí equatorial C2 hoặc/và C3, vùng $835-840$ và $845-860\text{ cm}^{-1}$ lần lượt đặc trưng cho liên kết C-O-S ở vị trí C2/C4 và C4, vùng $1240-1272\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị của S = O, vùng $1610-1625\text{ cm}^{-1}$ và 1410 cm^{-1} đặc trưng cho dao động đối xứng và không đối xứng của nhóm cacboxylat.

3.5.1.1 Phổ hồng ngoại IR phân đoạn F1



Hình 3.8. Phổ hồng ngoại phân đoạn F1

Bảng 3.7. Các peak đặc trưng phổ IR phân đoạn F1

Peak (cm ⁻¹)	Dao động đặc trưng
405,05; 420,48	C=O (co dẫn)
576,72	S-O
667,37	C-Cl
812,03	C-O-S
896,83	N-H (lắc)
1029,99	C-O-C
1220,94	S=O hoặc C-O
1413,82	C-N (nhóm acetyl)
1541,12	N-H (biến dạng)
1633,71	C=C (co dẫn)
2931,80	C-H
3288,63	O-H

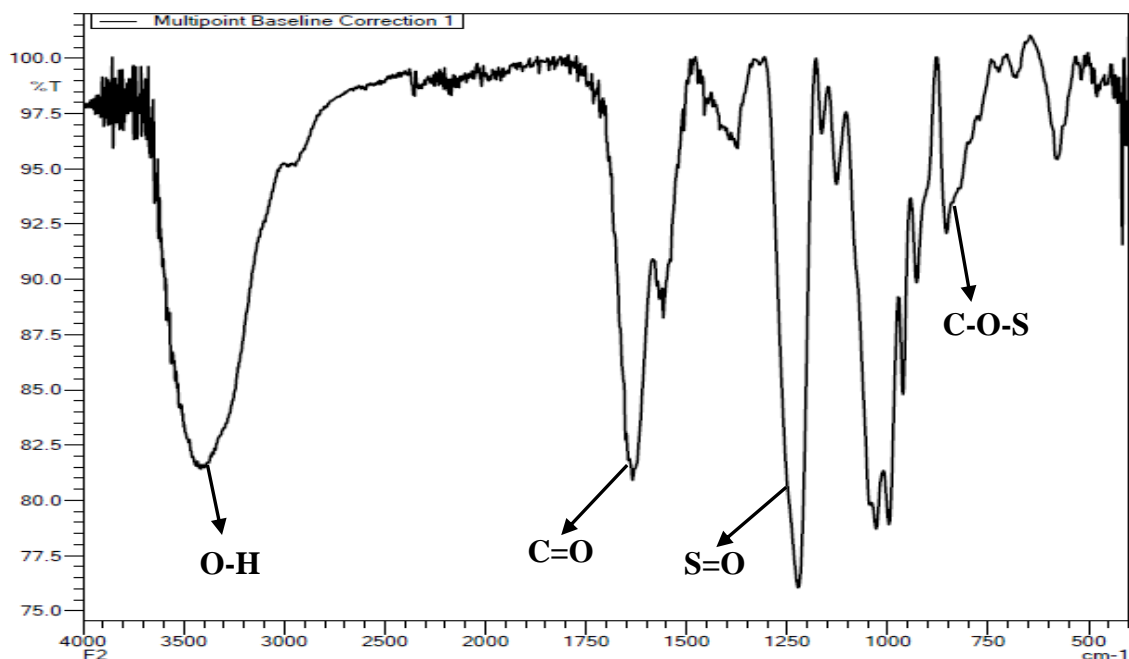
Từ kết quả phân tích phổ phân đoạn F1 (hình 3.8), phân tích tổng hợp các

peak tín hiệu và dao động đặc trưng của các nhóm chức. Sau đó dựa vào các nghiên cứu về dao động đặc trưng nhóm chức bảng 2.1 [83], [84], kết hợp với các nghiên cứu đã công bố về các loài hải sâm khác để đưa ra các nhận xét về các peak đặc trưng ở mỗi phân đoạn là dao động đặc trưng cho nhóm liên kết nào.

Theo đó các peak $1413,82\text{ cm}^{-1}$, $1541,12\text{ cm}^{-1}$, $896,83\text{ cm}^{-1}$ là các dao động lắc, biến dạng, co dãn đặc trưng của nhóm C-N (acetyl) và liên kết N-H, đây chính là nhóm N-Acetyl trong gốc GalNAc, một trong hai nhóm của fucosylate chondroitin sulfated. Nhóm uronic acid cũng được chứng minh bởi các dao động co dãn C=O ở peak $405,05\text{ cm}^{-1}$ và $420,48\text{ cm}^{-1}$, liên kết C-O thể hiện qua dao động $1220,94\text{ cm}^{-1}$; $1029,99\text{ cm}^{-1}$, liên kết O-H co dãn ở peak $3288,63\text{ cm}^{-1}$. Đây là các dao động trong nhóm cacboxyl COOH ở các gốc acid hữu cơ. Ngoài ra còn có các dao động khác như C=C thể hiện liên kết trong các gốc đường, C-H liên kết trong tất cả các hợp chất hữu cơ.

Sự sulfate hóa có thể thấy qua việc tồn tại các dao động của nhóm $-\text{OSO}_3$ và liên kết C-O-S. Ở phân đoạn F₁, liên kết C-O-S thể hiện qua số sóng $812,03\text{ cm}^{-1}$ còn các liên kết trong O-SO₃ thì xuất hiện trên các peak $576,72\text{ cm}^{-1}$, $1220,94\text{ cm}^{-1}$. Ngoài ra còn thấy có xuất hiện của các peak không rõ chính xác của dao động nào, vì các dao động đôi khi có sự giống nhau trong vùng phổ hấp phụ, gây chồng phổ, khó biết chính xác. Đôi khi các tạp chất còn lẫn trong quá trình tách phân đoạn cũng là một nguyên nhân gây khó khăn khi xác định dao động đặc trưng. Đơn cử trong trường hợp này là sự xuất hiện của dao động $667,37\text{ cm}^{-1}$ của liên kết C-Cl, điều này có thể là do quá trình rửa giải bằng NaCl đã xảy ra quá trình thế các gốc Cl⁻ vào mạch phân tử.

3.5.1.2 Phổ hồng ngoại IR phân đoạn F2



Hình 3.9. Phổ hồng ngoại phân đoạn F2

Bảng 3.8. Các peak đặc trưng phổ IR phân đoạn F2

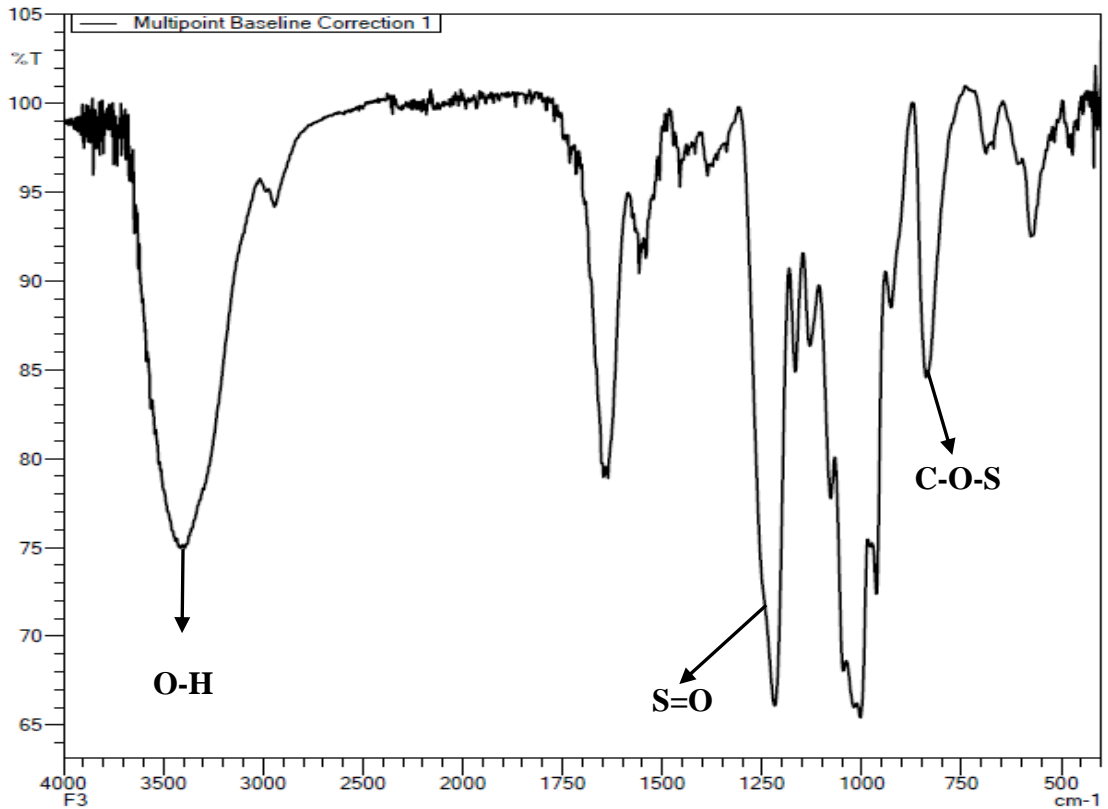
Peak (cm ⁻¹)	Dao động đặc trưng
406,98; 416,62; 428,2	C=O (co dẫn)
578,64	S-O
685,66	C-Cl
854,47	C-O-S (4-O-Sulfated)
962,48	C-O (co dẫn)
1043,49	C-O-C
1128,36	C-C-C
1165	C-O
1225,01	S=O
1373,32	C-N (nhóm acetyl)
1506,41	N-H (biến dạng)
1558,48	N-H (biến dạng)
1633,71	N-H (biến dạng)
2945,30	C-H
3423,65	O-H

Tương tự như ở F1, ở F2 cũng thấy xuất hiện các peak đặc trưng cho sự có mặt của GalNAc, uronic acid và sự sulfate hóa. Các peak có thể kể đến như sau:

- Nhóm GalNAc được xác nhận thông qua các tín hiệu ở: $1506,41\text{ cm}^{-1}$, $1558,48\text{ cm}^{-1}$, $1633,71\text{ cm}^{-1}$ và $1373,32\text{ cm}^{-1}$ thể hiện dao động biến dạng của liên kết N-H và C-N trong acetyl.
- Nhóm sulfate được xác nhận thông qua một số tín hiệu đặc trưng như sau: $1225,01\text{ cm}^{-1}$, $578,64\text{ cm}^{-1}$, $854,47\text{ cm}^{-1}$ với các dao động hấp phụ tương ứng của các liên kết S=O, S-O và C-O-S. Ở trường hợp này, liên kết được xác định là liên kết ở vị trí O-4 và hoặc O-2/O-4. Đây cũng là vị trí liên kết từng được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây.
- Nhóm Uronic acid với các dao động co dãn C=O ở số sóng 406 cm^{-1} , 416 cm^{-1} , 428 cm^{-1} và C-O ở 1165 cm^{-1} .

Như vậy cả hai giai đoạn F1 và F2 đều cho ta những minh chứng về sự xuất hiện của FCS với các nhóm GlcA và GalNAc bằng các dao động đặc trưng liên kết trong phân tử chúng. Mặc dù có sự xuất hiện các tín hiệu nhiều, cũng như việc còn tạp chất trong quá trình tách phân đoạn, tuy nhiên các minh chứng trên cũng là thuyết phục về cấu trúc FCS ở phân đoạn F1 và F2 của GAG hải sâm *H. leucospilota*. Điều này cũng tương đồng với các nghiên cứu trước đó và các phân đoạn chiết tách từ các loài hải sâm trên thế giới. Như loài *Holothuria edulis* [73] phân đoạn F1, F2 cũng là FCS nhưng khác ở chỗ các vị trí sulfate hóa là C2 hoặc/và C3. Hay cũng về loài *H. leucospilota* nhưng được thực hiện bởi Piaopiao Qiu (2020) cùng các cộng sự thì cho thấy vị trí thế nhóm sulfate ở FCS là C4 và/hoặc C6 [93].

3.5.1.3 Phổ hồng ngoại IR phân đoạn F3



Hình 3.10. Phổ hồng ngoại phân đoạn F3

Bảng 3.9. Các peak đặc trưng phổ IR phân đoạn F3

Peak (cm ⁻¹)	Dao động đặc trưng
572,86	S-O
690,52	C-Cl
837,11	C-O-S (2,4-di-O-SO ₃ hoặc 6-O--SO ₃)
964,41	C-O (co dẫn)
1045,42	C-O-C
1130,29	C-C-C
1166,93	C-O
1219,01	S=O
1454,33	O-H (biến dạng)
1641,42	C=C hoặc N-H (biến dạng)
3417,86	O-H (co dẫn)

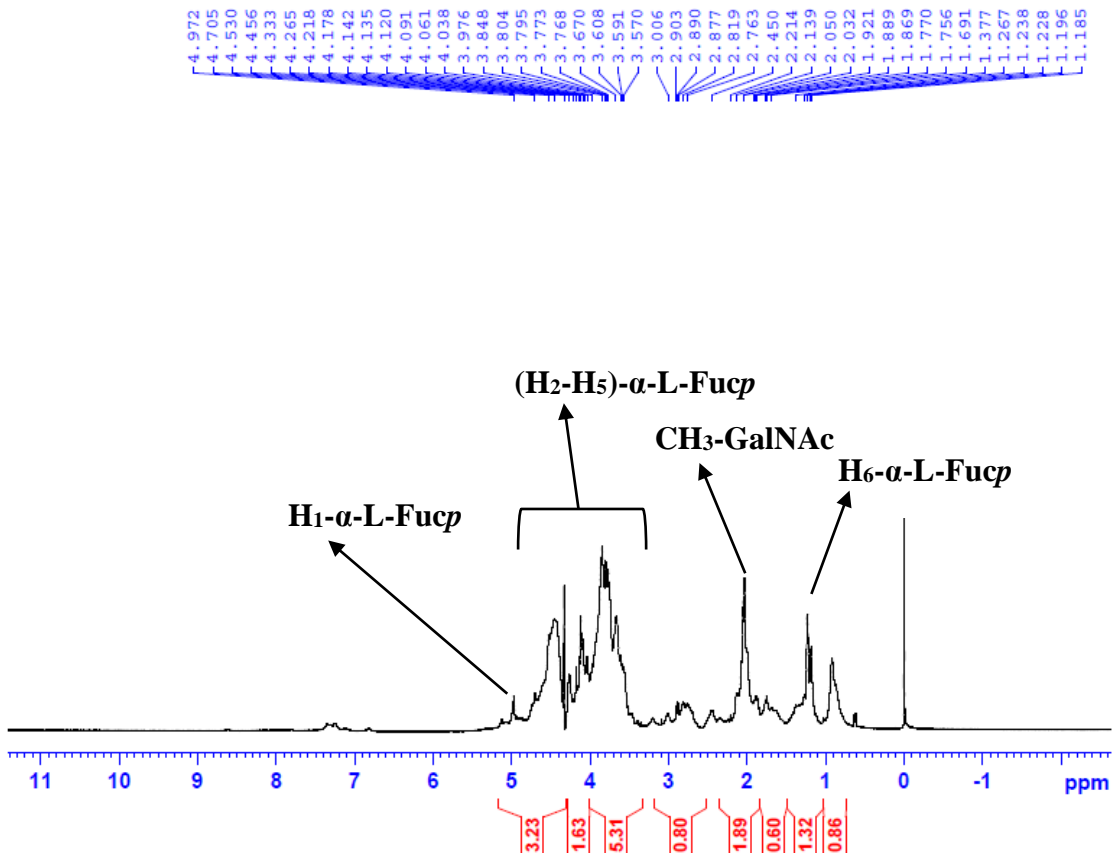
Không giống với hai phân đoạn F1, F2, phân đoạn F3 thuộc nhóm fucan sulfate (FS) nên trên phổ của phân đoạn này không có các tín hiệu chỉ ra sự có mặt của gốc uronic acid như trong hai phân đoạn F1, F2. Kết quả này một lần nữa xác nhận kết quả phân tích hàm lượng uronic acid bằng phương pháp hóa học. Mặc dù vậy, trên phổ IR của phân đoạn F3 cũng xuất hiện các tín hiệu đặc trưng cho sự có mặt của nhóm sulfate, kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích hàm lượng sulfate đã được chỉ ra trong phần 3.3 đã được trình bày ở trên. Quả thật vậy, ngoài các dao động C=C ở số sóng $1641,42\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng liên kết trong mạch các đường đơn Fuc, Gal, Glu,.. hay liên kết không thể thiếu trong các hợp chất hữu cơ đó là C-H ở tần số $2943,37\text{ cm}^{-1}$. Trong phổ IR phân đoạn này không thấy xuất hiện các liên kết C-N hay N-N, đặc trưng cho nhóm GalNAc. Kết quả đo phổ IR của phân đoạn F3 (hình 3.10) cho thấy tín hiệu hấp thụ ở vùng số sóng 1219 cm^{-1} là tín hiệu hấp thụ đặc trưng của liên kết S = O [87] chứng tỏ sự có mặt của nhóm sulfate trong phân tử của phân đoạn F3-GAGs, bên cạnh đó ta còn quan sát thấy tín hiệu mạnh ở vùng số sóng $837,11\text{ cm}^{-1}$ chỉ ra vị trí của nhóm sulfate ở C4 và/hoặc C2/C4 của vòng fucose [85], [87]. Như vậy, phổ IR cho ta biết sự có mặt của nhóm sulfate trong phân tử GAGs và một phần thông tin về vị trí của chúng trong gốc đường α -L-fucopyranose thông qua dao động của liên kết C-O-S. Tuy nhiên, để xác định chính xác vị trí của các nhóm sulfate chúng ta cần thêm những thông tin từ phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối (MS). Các kết quả tương tự cũng đã được chỉ ra trong các nghiên cứu trước đây về FS ở các loài hải sâm *Stichopus variegatus* [48], *Holothuria edulis* [73], *Holothuria atra* [75], *Stichopus horrens* [76], *Holothuria spinifera* [77], *Holothuria polii* [83]. Các nghiên cứu đã xác nhận sự khác nhau về vị trí các gốc sulfate trong vòng fucose cũng như trật tự các liên kết giữa các gốc đường fucose và fucose sulfate ở mỗi loài hải sâm. Các nghiên cứu về FS ở *Stichopus horrens* cho thấy vị trí nhóm thế là 2-O, 4-O, còn ở *Holothuria edulis* chỉ phát hiện nhóm thế ở vị trí 4-O trong khi đó ở *Stichopus variegatus* ghi nhận các nhóm thế là 2-O hoặc/và 4-O-sulfated [48],[73],[76].

3.5.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$

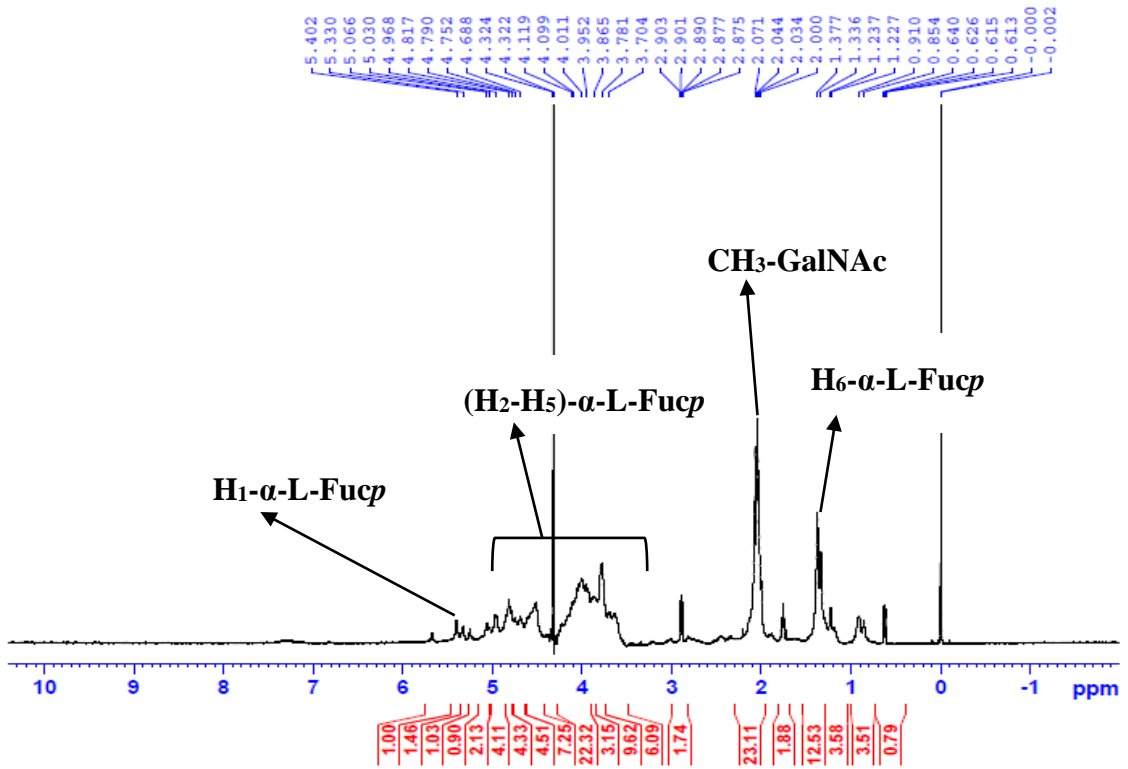
Phổ hồng ngoại IR chỉ đo được các thay đổi của mômen lưỡng cực trong một phân tử. Do đó phổ IR chỉ giúp ta xác định được các loại dao động đặc

trung của các liên kết, nhóm chức có trong phân tử, chỉ ra thành phần một số loại nhóm chức trong phân tử. Phổ IR không cho ta biết được thông tin về các liên kết glycoside hay kiểu liên kết glycoside giữa các gốc đường. Do đó, để có thêm các thông tin về cấu trúc của các hợp chất hữu cơ nói chung và hợp chất glycosaminoglycan nói riêng cần thiết phải tiến hành phân tích thêm trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của các hợp chất này.

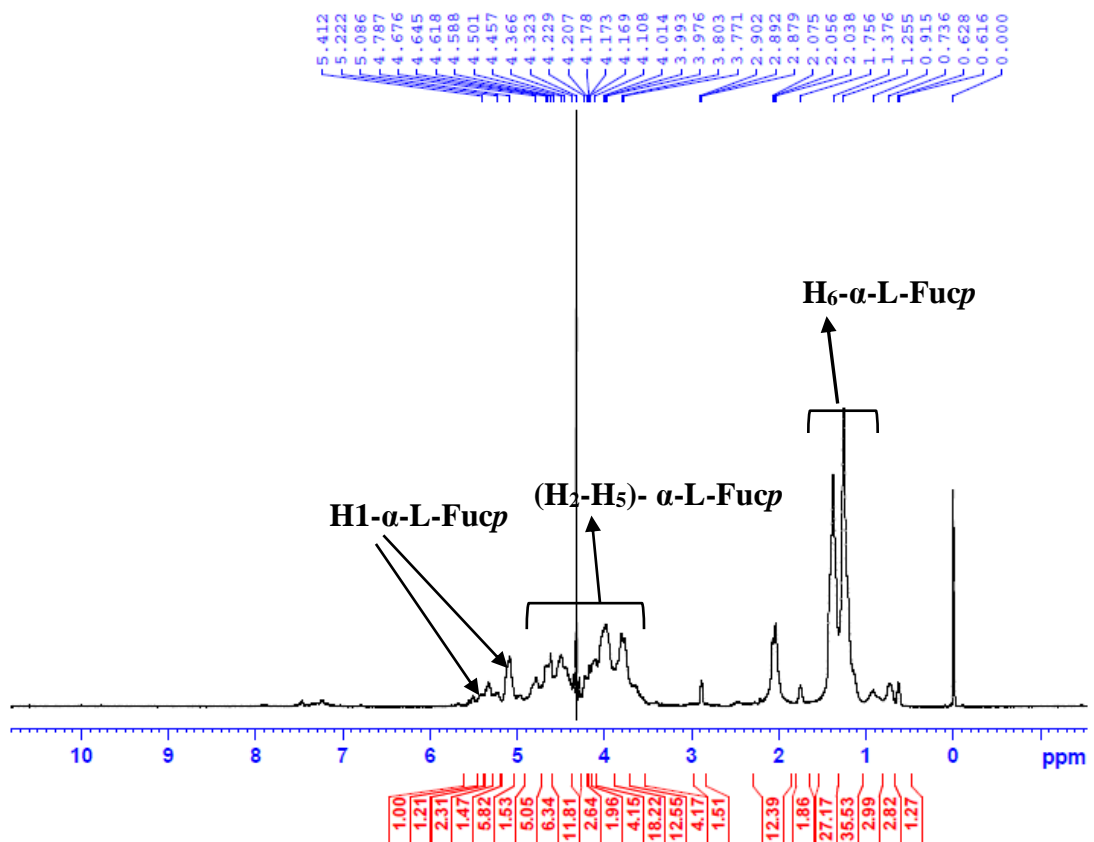
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ của các phân đoạn F1, F2 và F3 (Hình 3.11, 3.12, 3.13) đã được đo trên máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân phân tử cao Bruker AvanceNeo 600MHz tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tương tự như glycosaminoglycan của nhiều loài hải sâm khác trên thế giới đã được công bố trước đây [1], [2], [47], [48], [50], [52] phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ của phân đoạn F1, F2, F3 có chứa các tín hiệu mạnh và rõ ràng ở vùng trường cao 1,23-1,37 ppm và vùng trường thấp 5,03-5,40 ppm đặc trưng cho proton H_6 của nhóm methyl (CH_3) và proton H_1 của gốc α -(1,3)-L-fucose [50], [52].



Hình 3.11. Phổ cộng hưởng từ $^1\text{H-NMR}$ phân đoạn F1



Hình 3.12. Phổ cộng hưởng từ $^1\text{H-NMR}$ phân đoạn F2



Hình 3.13. Phổ cộng hưởng từ $^1\text{H-NMR}$ phân đoạn F3

Qua đó tham khảo thêm những dữ liệu từ các nghiên cứu khác về những loài hải sâm khác nhau [49], [51], [53], [55], [75], [78], [77], [83], [94] có thể thấy phổ cộng hưởng từ $^1\text{H-NMR}$ của 3 phân đoạn khá phức tạp và có sự chồng chéo các tín hiệu gây nhiễu thông tin đáng kể. Nguyên nhân gây ra sự trùng lặp, nhiễu tín hiệu này có thể là do trong thành phần cấu trúc các FCS có chứa các nhóm chức phức tạp, đa dạng về mật độ nhóm sulfate lẫn kiểu liên kết khác nhau. Do đó chỉ có thể giải đoán phổ căn cứ vào các vùng tín hiệu đặc trưng của hai nhóm hợp chất, mà không thể đưa ra giải thích được một cách chi tiết tất cả các tín hiệu trên phổ, hoặc kết luận một cách chính xác.

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của 02 đoạn F1, F2 cho ta biết thêm những vùng tín hiệu đặc trưng cho fucosylated chondroitin sulfate (FCS) thông qua vùng tín hiệu từ 2,0 - 2,1 ppm là sự hiện diện proton nhóm acetyl của vòng GalNAc ($\text{CH}_3\text{CO-}$). Ở cả 2 nhóm đều có các tín hiệu phổ khá giống nhau và đều có vùng tín hiệu 2,0 đến 2,07ppm chứng minh cả 2 phân đoạn đều thuộc nhóm FCS [2], [52]. Mặc khác trong vùng độ chuyển dịch hóa học từ 5,0 đến 5,8 là vùng tín hiệu đặc trưng của proton anomeric H1 của vòng fucose và fucose sulfate [1], [2]. Các nhóm sulfate khi có mặt trong vòng fucopyranose gây ra ảnh hưởng đến độ dịch chuyển của proton anomeric, vì vậy trong vùng tín hiệu này ta quan sát thấy một nhóm các tín hiệu trong vùng từ 5,03-5,40 ppm có thể đưa ra dự đoán về sự tồn tại của nhiều gốc đường fucose với các mức độ sulfate hóa khác nhau [2], [52], [55], [56].

Trên phổ của phân đoạn F3 không thấy xuất hiện các tín hiệu của các nhóm acetyl của vòng GalNAc ($\text{CH}_3\text{CO-}$), điều này chứng tỏ F3 không phải là FCS. Tín hiệu trên phổ hình 3.13 cho thấy F3 chỉ chứa vòng fucose và các nhóm sulfate hóa nên càng khẳng định đây là phân đoạn chứa FS. Trong vùng độ chuyển dịch từ 5,0 đến 5,8 là vùng quan sát cho thấy sự có mặt của nhóm sulfated và vòng fucose. Hai tín hiệu độ chuyển dịch hóa học ở 5,67 ppm và 5,4 ppm, thể hiện tương ứng cho proton anomeric H1 của vòng pyranose với 2,4-O-disulfated fucose (Fuc2S4S).

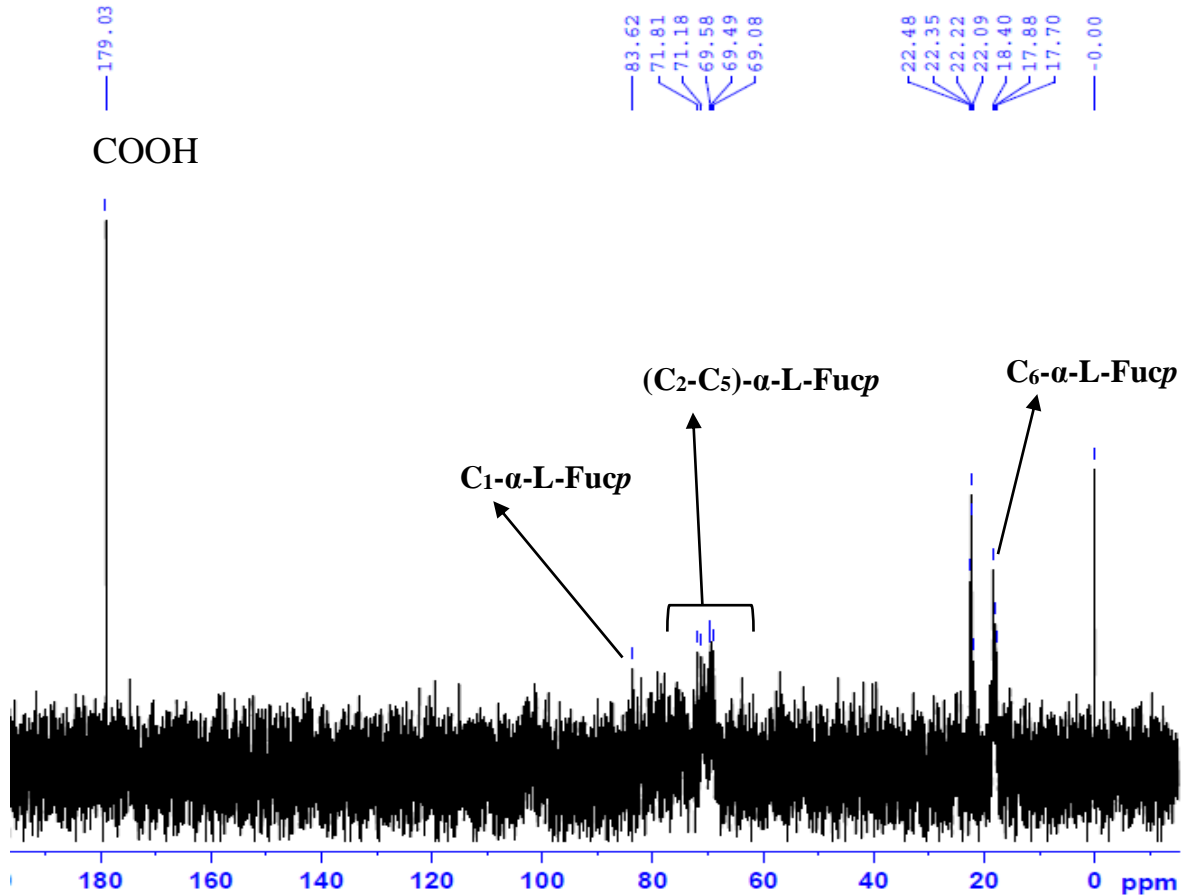
Các vùng tín hiệu proton có độ chuyển dịch hóa học từ 3,3 đến 4,4 ppm thuộc về nhóm tín hiệu của các proton H2 - H5 của vòng pyranose ở các phân đoạn F1, F2, F3. Tuy vậy, do các tín hiệu phổ có độ phân giải kém, nhiễu tín hiệu chồng chéo lên nhau nên rất khó để có thể giải thích được tường minh từng

tín hiệu trong vùng độ dịch chuyển hóa học của các proton H2-H5 [2]. Nhìn chung, các tín hiệu đặc trưng trong vùng trường cao thuộc về nhóm proton H6 và vùng trường thấp thuộc về các proton H1 cho thấy có sự tương đồng với phổ proton của FCS và FS đã được nghiên cứu từ nhiều loài hải sâm trên thế giới công bố trước đây [2], [52], [55], [56]. Các dữ liệu ghi nhận được từ phổ $^1\text{H-NMR}$ cũng tương tự với nghiên cứu của Piaopiao Qiu và cộng sự trên *H. leucospilota* [93] khi cho thấy các nhóm thế là 2,4-O-disulfated fucose. Bên cạnh đó là các tín hiệu liên kết H-H khác ở nguyên tử C4, C6 thấy hơn gợi ý cho kiểu sulfate hóa ở vị trí 4-O hoặc/và 6-O, một số chỉ là 2-O hoặc không sulfate hóa và lượng nhỏ là 3,4-O-disulfated fucose. Nhìn chung các FCS và FS ở các loài hải sâm khác cũng có kết quả phân tích tương tự, chỉ khác vị trí sulfate hóa trong vòng pyranose [49], [51], [55], [76], [85], [88], [90].

Bên cạnh các thông tin về cấu trúc thu nhận được từ phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$, phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$ cũng cho biết thêm thông tin về kiểu liên kết trong cấu trúc của các polymer dạng FCS và FS của hải sâm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn phân đoạn F2 là phân đoạn có hàm lượng lớn nhất làm phân đoạn đại diện cho glycosaminoglycan của hải sâm *H. leucospilota*, các nghiên cứu về glycosaminoglycan hải sâm hầu hết thường tập trung vào nghiên cứu cấu trúc và hoạt tính sinh học của phân đoạn này, do có cấu trúc hóa học biến đổi rất đa dạng và sở hữu nhiều hoạt tính sinh học quý. Bên cạnh đó, FCS cũng có cấu trúc rất đặc thù mà không một loài động vật hay thực vật nào có ngoài hải sâm.

3.5.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$ của phân đoạn F2 được chỉ ra trong hình 3.14.



Hình 3.14. Phổ ^{13}C -NMR của phân đoạn F2

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR của phân đoạn fucosylated chondroitin sulfate F2 *H. leucospilota* (hình 3.14), cũng giống như nhiều fucosylated chondroitin sulfate của các loài hải sâm khác đã được công bố [2][89][91], trên phổ ^{13}C -NMR của phân đoạn F2 có các tín hiệu ở vùng nhận dạng đặc trưng của gốc α -L-Fucp tương đối rõ ràng (hình 3.5) có thể nhận ra tín hiệu mạnh trong các vùng aromatic (83,9205 ppm) và vùng trường cao (17,7-18,4 ppm) đặc trưng của C-1 và C-6 vòng 1 \rightarrow 3- α -L-Fucp [50], [95]. Thêm vào đó là tổ hợp của các tín hiệu ở vùng có độ dịch chuyển hóa học 69,08-71,81 ppm là của cacbon vòng pyranose C2-C5 [2][56][89][91]. Các dữ liệu phổ này cho thấy cấu trúc tương đối đơn giản của phân đoạn F2 so với các polysaccharide từ rong biển và FCS từ các động vật biển không xương sống khác [96]. Polysaccharide sulfate từ rong biển hay các loài hải sâm khác có phổ ^{13}C -NMR tương đối phức tạp các tín hiệu chính phần lớn cho thấy mức độ đa bội nhất định [95], [69], [43]. Điều này chỉ ra sự đa dạng trong vị trí của các liên kết glycosidic và/hoặc mô hình sulfate hóa kép. Trên phổ hình 3.14 cũng xác nhận sự có mặt của các nhóm Acetyl thông qua các tín hiệu ở độ dịch

chuyển hóa học 22,09-22,48 ppm và sự có mặt của cacbon carboxylic của nhóm uronic acid thông qua tín hiệu ở 179,03 ppm, kết quả này cũng cho thấy sự phù hợp với kết quả phân tích thành phần hóa học của phân đoạn F2 đã được đưa ra trong bảng 3.2. Kết quả này cũng giống với báo cáo của Piaopiao Qiu trên *H. leucospilota* [93] khi cho thấy liên kết trong mạch cũng là linked α (1 \rightarrow 3), bên cạnh đó còn là linked α - (1 \rightarrow 4). Tuy nhiên mạch FCS trong nghiên cứu của Qiu và cộng sự [93] là một mạch với cấu trúc mạch nhánh khá lớn có thể lên đến 9 đơn vị lặp lại các vòng fucose. Mạch chính được xác nhận là một cấu trúc dị thể GlcA \rightarrow GalNAc4S6S và GlcA \rightarrow GalNAc6S. Một vài báo cáo khác về các loài hải sâm khác nhau cũng được công bố như liên kết 1,2- và 1,3-linked α -L-fucopyranose ở hải sâm *Stichopus variegatus* [48], *Stichopus horrens* [76] và *Holothuria floridana* [49] với (1 \rightarrow 3)- α -fucopyranose,...

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đề tài luận văn đã đạt được những kết quả chính sau:

1. Glycosaminoglycans (GAGs) đầu tiên đã được chiết tách, phân lập từ hải sâm *Holothuria leucospilota* thu ở vùng biển Việt Nam. GAGs được chiết tách theo phương pháp thủy phân với enzyme papain (2000 UI/g) trong môi trường đệm acetate 0,1M (pH 6) có chứa 5mM EDTA và 5 mM L-cystein. Kết quả hàm lượng GAGs thu nhận được đạt 4,7 %.
2. Kết quả phân tích thành phần hóa học của GAGs cho thấy có chứa các gốc đường chính là Glucuronic acid, N-acetyl Galactosamin, Galactose và Fucose, hàm lượng sulfate và uronic acid lần lượt là 26,59% và 22,3%.
3. Glycosaminoglycans của hải sâm *Holothuria leucospilota* được tách phân đoạn, tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi anion trên nhựa DEAE-Macro prep cho ra 3 phân đoạn tương ứng F1, F2 và F3. Kết quả phân tích thành phần đường đơn của các phân đoạn cho thấy phân đoạn F1, F2 thuộc nhóm fucosylated chondroitin sulfate và F3 thuộc nhóm fucan sulfate.
4. Một số đặc trưng cấu trúc của các phân đoạn GAGs đã được xác định bằng các phương pháp phân tích phổ IR và NMR. Các phân đoạn F1, F2 có cấu trúc khung mạch chính gồm các gốc GlcA→GalNAc liên kết 1,4 với các nhánh fucan sulfate ở vị trí 3-O của gốc đường glucuronic acid. Nhóm sulfate chủ yếu ở vị trí C4 của các gốc đường fucose và galactose và một lượng nhỏ ở các vị trí 2,3-di-O. Phân đoạn F3 là một fucan sulfate với cấu trúc mạch chính (1→3)- α -Fucopyranose, kiểu sulfate hóa là 2,4-O-disulfated fucose.

KIẾN NGHỊ

Glycosaminoglycan hải sâm thuộc nhóm polysaccharide có hoạt tính sinh học rất đa dạng, tiềm năng ứng dụng lớn. Để có thể phát triển nhóm các hợp chất này thành các hợp chất hữu ích bảo vệ sức khỏe cộng đồng cần tiếp tục nghiên cứu đánh giá về các hoạt tính sinh học (như hoạt tính chống đông máu, tăng cường miễn dịch, kháng u,...) và cấu trúc chi tiết của GAGs để từ đó làm cơ sở cho việc phát triển ứng dụng các hợp chất GAGs này một cách hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dong Xiaodi, Changhai Wang, Gengmao Zhao, Rujia Pan., 2014, Separation purification, anticoagulant activity and preliminary structural characterization of two sulfated polysaccharides from sea cucumber *Acaudina molpadioidea* and *Holothuria nobilis*, *Process Biochemistry*, 49, pp. 1352-1361.
2. Ustyuzhanina NE, Bilan MI, Anisimova NY, Dmitrenok AS, Kusaykin MI, Stonik VA, Nifantiev NE, Shashkov AS, Usov AI, 2016, Structure and biological activity of a fucosylated chondroitin sulfate from the sea cucumber *Cucumaria japonica*, *Glycobiology*, 26(5):449-59.
3. PA Mourão, IG Bastos, 1987, Highly acidic glycans from sea cucumbers isolation and fractionation of fucose rich sulfated polysaccharides from the body wall of *Ludwigothurea grisea*, *European Journal of Biochemistry*, 166(3):639-45.
4. Myron, P., Siddiquee, M., and Azad, S., 2014, Fucosylated chondroitin sulfate diversity in sea cucumbers: A review. *Carbohydrate Polymers*, 112:173-8.
5. Bordbar, S., Anwar, F. and Saari, N., 2011, High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods - A review. *Marine Drugs*, 9(10), pp. 1761-1805.
6. Alexander M. Kerr, Junhyong Kim, 2001, Phylogeny of Holothuroidea (Echinodermata) inferred from morphology, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 133(1), pp. 63-81.
7. Đào Tấn Hồ, 2006, Đặc điểm hình thái các loài hải sâm có giá trị thương mại ở biển Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ biển*, T6(2), tr. 72-89.
8. Crozier, W. J. 1915, The sensory reactions of *Holothuria surinamensis*. *Zool*, 35, pp 231- 297. 1918, *The amount of bottom material ingested by holothurians*, 26, pp. 379-389.
9. Sven Uthicke, 1999, Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria* (*Halodeima*) *atra* and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, Great Barrier Reef, *Bulletin of Marine Science*, 64(1), pp. 129-141.

10. David L. Pawson, Doris J. Pawson, 2008, *An illustrated key to the sea cucumbers of the South Atlantic Bight*, Southeastern Regional Taxonomic Center, Charleston, USA.
11. De Leo, F.C., Smith, C.R., Rowden, A.A., Bowden, D.A. and Clark, M.R., 2010, Submarine canyons: hotspots of benthic biomass and productivity in the deep sea, *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences*, 277(1695), pp. 2783-2792.
12. Purcell, Yves Samyn, Y. Conand, Liu, Commercially important sea cucumbers of the world. *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*, No. 6. Rome, FAO, p. 155.
13. Vicki Hsieh, 2012, *Monitoring organ regeneration of sea cucumber *Holothuria leucospilota* after evisceration*, Student Research Papers, Fall 2012, University of California, Berkeley, p. 11.
14. Nguyễn Đình Quang Duy, 2005, *Hoàn thiện công nghệ sản xuất giống hải sâm cát loài *holothuria scabra* tại Nha Trang*, Khánh Hòa, Báo cáo khoa học, Viện Nghiên Cứu Nuôi trồng Thủy Sản III.
15. Conand, C., 2004, Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora (CITES): conservation and trade in sea cucumbers, *S.P.C. Bêche-de-mer Information Bull*, 20, pp. 3–5.
16. Ramofofia, C., Battaglione, S.C., Bell, J.D. and Byrn, M., 2000, Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands, *Mar. Biol*, 136, pp. 1045–1056.
17. Lovatelli, A., Conand, C., Purcell. S., Uthicke, S., Hamel, J.-F. and Mercier, A., 2004, *Advances in sea cucumber aquaculture and management*, FAO, Fisheries Technical Paper No. 463.
18. Johann Friedrich Brandt, 1835, *Prodromus descriptionis animalium ab H. Mertensio observatorum: fascic. I. Polypos, Acalephas Discophoras et Siphonophoras, nec non Echinodermata continens*, Sumptibus Academiae, p. 251.
19. Lane D.J.W., Vandenspiegel D., 2003, *A Guide to Sea Stars and Other Echinoderms of Singapore*, *Singapore Science Centre*, p. 187.
20. Taquet, C., F. Setiawan, N. Yasuda, Suharsono & K. Nadaoka, 2011, First observation of a large group of *Holothuria leucospilota* sea cucumber

- juveniles at a nursery in Manado (north Sulawesi, Indonesia). *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, 31, pp. 30-34.
21. S.M. Gaudron, Chantal Conand, 2008, Reproduction of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* in the Western Indian Ocean: Biological and ecological aspects, *Invertebrate Reproduction and Development*, 51:1, pp. 19-31.
 22. Ilias Z, 2010, Gamatperairan Malaysia: kepelbagaian spesies dan kegunaannya, *DewanBahasadanPustaka, Kuala Lumpur*, p. 106.
 23. C. Conand, 1990, The fishery resources of Pacific island countries. Part 2: Holothurians, F.A.O. *Fisheries Technical Paper, Rome*, No. 272 (2), p. 143
 24. Neses Omran, 2013, Nutritional value of some Egyptian sea cucumbers, *African Journal of Biotechnology*, 12(35):5466-5472.
 25. Thai Tran Bai, 2004, *Dong vat hoc khong xuong song*, Education publish, pp. 335-337.
 26. A.W. Bruckner, K.A. Johnson, J.D. Field, 2003, Conservation strategies for sea cucumbers: Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade, *SPC Bêche-de-mer information Bulletin*, 18(1), pp. 24-33.
 27. Conand, C., Purcell, S. & Gamboa, 2013, *Holothuria leucospilota*, The IUCN Red List of Threatened Species.
 28. Afkhami, M., Ehsanpour, M., Dabbagh, A.R., Sarhadizadeh, N. and Mirzadeh, G., 2012, New observation of two sea cucumber species from Abu Musa Island (Persian Gulf, Iran), *European Linnean Society*, 157(1), pp. 51-69.
 29. D.L. Aminin, E.s. Menchinskaya, E.A. Pislyagin, A.s. Silchenko, S.A. Avilov, V.I. Kalinin, 2016, *Sea Cucumber Triterpene Glycosides as Anticancer Agents*, in: Stud. Nat. Prod. Chern.
 30. MDR Oedjoe, 2017, *Composition of Nutritional Content of Sea Cucumbers (Holothuroidea) in Mania Waters, Sabu Raijua Regency, East Nusa Tenggara*, J Aquac Res Development 8: 502.
 31. Wen J, Hu C, Fan S, 2010, *Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers*, J Sci Food and Agri 90: 2469-2474.

32. Bộ thủy sản , *Nguồn lợi thủy sản của các nước ở các đảo của Thái Bình Dương- phần 2: Hải sâm*, Trung tâm thông tin KH-KT và kinh tế thủy sản.
33. Abdullah Rasyid, Tutik Murniasih, Masteria Y. Putra, Ratih Pangestuti, Iskandar A. Harahap, Febriana Untari, Sari B. M. Sembiring, 2017, Evaluation of nutritional value of sea cucumber *Holothuria scabra* cultured in Bali, Indonesia, *Research Center for Biotechnology, Indonesian Institute of Sciences*.
34. Salarzadeh AR, Afkhami M, Bastami KD, Ehsanpour M, Khazaali A, et al, 2012, Proximate composition of two sea cucumber species *Holothuria pavra* and *Holothuria arenicola* in Persian Gulf, *Ann Biol Res* 3, pp. 1305-1311.
35. Ridzwan H, Hanita MH, Nurzafirah M, Siti NMP, Farah HZ, 2014, Free fatty acids composition in lipid extracts of several sea cucumbers species from Malaysia, *IJBB* 4, pp. 204-207.
36. Nadezhda E. Usryuzhania, Maria I. Bilan, Andrey S. Dmitrenok, Eugenia A. Stonik, Nikolay E. Nifantiev, Anatolii I. Usov, 2016, Structural characterization of fucosylated chondroitin sulfates from sea cucumbers *Apostichopus japonicus* and *Actinopyga mauritiana*, *Carbohydrate Polymers*, 153, pp. 399-405.
37. Barzkar N., Fariman G. A., Taheri A., 2017, Proximate composition and mineral contents in the body wall of two species of sea cucumber from Oman Sea, *Environmental Sciences and Pollution Research* 24(23), pp. 18907-18911.
38. Sroyraya M., Peter J. H., Tanapan S., Ruchanok T., Prapaporn J., Tanate P., Prasert S., 2017, Nutritional components of the sea cucumber *Holothuria scabra*, *Functional Foods in Health and Disease* 7(3), pp. 168-181.
39. Chsaro, C. M. F. and Dietrich, C. P., 1977, Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates, *J. Biol. Chem.*, pp. 252-254.
40. Bilan, M.I.; Grachev, A.A.; Ustuzhanina, N.E, 2002, Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydr. Res*, 337, pp. 719-730.

41. Patankar, M.S.; Oehninger, S.; Barnett, T, 1993, A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem*, 268, pp. 21770-21776.
42. Shiguo Chen, Yaqin Hu, Xinqian Ye, Gouyun Li, Yu, Changhu Xue, Wengang Chai, 2012, Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj*, 1820, pp. 989–1000.
43. Chang, Y.; Hu, Y.; Yu, L.; McClements, D.J.; Xu, X.; Liu, G.; Xue, C, 2016, Primary structure and chain conformation of fucoidan extracted from sea cucumber *Holothuria tubulosa*. *Carbohydr. Polym*, 136, pp. 1091–1097.
44. Hu, Y.; Li, S.; Li, J.; Ye, X.; Ding, T.; Liu, D.; Chen, J.; Ge, Z.; Chen, S, 2015, Identification of a highly sulfated fucoidan from sea cucumber *Pearsonothuria graeffei* with well-repeated tetrasaccharides units. *Carbohydr. Polym*, 134, pp. 808–816.
45. N. Gao, R. Chen, R. Mou, J. Xiang, K. Zhou, Z. Li, J. Zhao, 2020, Purification, structural characterization and anticoagulant activities of four sulfated polysaccharides from sea cucumber *Holothuria fuscopunctata*. *Int. J. Biol. Macromol*, 164, pp. 3421–3428.
46. Pham Duc Thinh, Bui Minh Ly, Roza V. Usoltseva, Natalia M. Shevchenko, Anton B. Rasin, Stanislav D. Anastyuk, Olesya S. Malyarenko, Tatiana N. Zvyagintseva, Pham Trung San, Svetlana P. Ermakova, 2017, A novel sulfated fucan from Vietnamese sea cucumber *Stichopus variegatus*: Isolation, structure and anticancer activity in vitro, *Biomac*.
47. J. Wang, S. Hu, W. Jiang, W. Song, L. Cai, 2016, Fucoidan from sea cucumber may improve hepatic inflammatory response and insulin resistance in mice, *Int Immunopharmacol*, 31, pp. 15–23.
48. Yiming Wang, Jingfeng Wang, Yanlei Zhao, Shiwei Hu, Di Shi, Changhu Xue, 2016, Fucoidan from sea cucumber *Cucumaria frondosa* exhibits anti-hyperglycemic effects in insulin resistant mice via activating the PI3K/PKB pathway and GLUT4, *J Biosci Bioeng*, 121(1), pp. 36–42.

49. Ning, Z.; Wang, P.; Zuo, Z.; Tao, X.; Gao, L.; Xu, C.; Wang, Z.; Wu, B.; Gao, N.; Zhao, J, 2022, A Fucan Sulfate with Pentasaccharide Repeating Units from the Sea Cucumber *Holothuria floridana* and Its Anticoagulant Activity, *Mar. Drugs*, 20, p. 377.
50. Long Yu ; Xue, C.; Chang, Y.; Hu, Y.; Xu, X.; Ge, L.; Liu, G, 2015, Structure and rheological characteristics of fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus*, *Food Chem*, 180, pp. 71–76
51. Ying Cai, Y.; Yang, W.; Yin, R.; Zhou, L.; Li, Z.; Wu, M.; Zhao, J, 2018, An anticoagulant fucan sulfate with hexasaccharide repeating units from the sea cucumber *Holothuria albiventer*, *Carbohydr. Res*, 464, pp. 12–18.
52. Ustyuzhanina, N.E.; Bilan, M.I.; Nifantiev, N.E.; Usov, A.I, 2019, New insight on the structural diversity of holothurian fucosylated chondroitin sulfates. *Pure Appl. Chem*, 91, pp. 1065–1071.
53. Paulo A G Soares, Kátia A Ribeiro, Ana P Valente, Nina V Capillé, Stephan-Nicollas M C G Oliveira, Ana M F Tovar, Mariana S Pereira, Eduardo Vilanova, and Paulo A S Mourão, 2018, A unique fucosylated chondroitin sulfate type II with strikingly homogeneous and neatly distributed α -fucose branches, *Glycobiology*, vol. 28, no. 8, pp. 565–579.
54. Santos, G.R.C.; Porto, A.C.O.; Soares, P.A.G.; Vilanova, E.; Mourão, P.A.S, 2017, Exploring the structure of fucosylated chondroitin sulfate through bottom-up nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry approach, *Glycobiology*, 27, pp. 625–634.
55. Gopakumar, K. and Gopakumar, B, 2020, *Health Foods From Ocean Animals*, Boca Raton, Florida: CRC Press.
56. Ustyuzhanina, N.E.; Bilan, M.I.; Dmitrenok, A.S.; Nifantiev, N.E.; Usov, A.I, 2017, Two fucosylated chondroitin sulfates from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*, *Carbohydr. Polym*, 164, pp. 8–12.
57. Soares, P.A.G.; Ribeiro, K.A.; Valente, A.P.; Capillé, N.V.; Oliveira, S.-N.M.C.G.; Tovar, A.M.F.; Pereira, M.S.; Vilanova, E.; Mourão, P.A.S, 2018, A unique fucosylated chondroitin sulfate type II with strikingly homogeneous and neatly distributed α -fucose branches, *Glycobiology*, 28, pp. 565–579.

58. Giulia Vessella , Serena Traboni , Antonio Laezza , Alfonso Iadonisi 1 and Emiliano Bedini , 2020, (Semi)-Synthetic Fucosylated Chondroitin Sulfate Oligo- and Polysaccharides, *Mar. Drugs*, 18, p. 293.
59. Slater, M. and Chen, J, 2015, *Use and Exploitation of Sea Cucumbers*, In (Eds, N.P.Brown and S.D. Eddy) *Echinoderm Aquaculture*, *New Jersey: Wiley-Blackwell*, pp. 57–73.
60. Liu, X., Liu, Y., Hao, J., Zhao, X., Lang, Y., Fan, F., et al, 2016, In Vivo Anti-Cancer Mechanism of Low-Molecular-Weight Fucosylated Chondroitin Sulfate (LFCS) From Sea Cucumber *Cucumaria Frondosa*, *Molecules* 21, p. 625.
61. Phạm Đức Thịnh, 2017, *Báo cáo: Nghiên cứu các hợp chất chuyển hóa thứ cấp từ một số sinh vật biển của vịnh Nha Trang sử dụng phương pháp chiết tách bằng CO₂ ở trạng thái siêu tới hạn*, Viện nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha trang.
62. Wang, J., Hu, S., Jiang, W., Song, W., Cai, L. and Wang, J, 2016, Fucoidan From Sea Cucumber May Improve Hepatic Inflammatory Response And Insulin Resistance In Mice, *Int. Immunopharmacol*, 31, pp. 15–23.
63. Li, S., Li, J., Mao, G., Wu, T., Hu, Y., Ye, X., et al, 2018, A Fucoidan From Sea Cucumber *Pearsonothuria Graeffei* With Well-Repeated Structure Alleviates Gut Microbiota Dysbiosis and Metabolic Syndromes in HFD-Fed Mice, *Food Funct*.
64. Xu, H., Wang, J., Chang, Y., Xu, J., Wang, Y., Long, T., et al., 2014, Fucoidan From The Sea Cucumber *Acaudina Molpadioides* Exhibits Anti-Adipogenic Activity By Modulating The Wnt/ β -Catenin Pathway And Down-Regulating The Srebp-1c Expression, *Food Funct*, 5, pp. 1547–1555.
65. Panagos, C. G., Thomson, D. S., Moss, C., Hughes, A. D., Kelly, M. S., Liu, Y., et al, 2014, Fucosylated Chondroitin Sulfates From The Body Wall Of The Sea Cucumber *Holothuria Forskali*: Conformation, Selectin Binding, And Biological Activity, *J. Of Biol. Chem*, 289, pp. 28284–28298.
66. Li, S., Li, J., Mao, G., Wu, T., Lin, D., Hu, Y., et al., 2019, Fucosylated Chondroitin Sulfate From *Isostichopus Badionotus* Alleviates Metabolic

- Syndromes And Gut Microbiota Dysbiosis Induced By High-Fat And High-Fructose Diet. *Int. J. Biol. Macromol*, 124, pp. 377–388.
67. Olivera-Castillo, L., Grant, G., Kantún-Moreno, N., Barrera-Pérez, H. A., Montero, J., Olvera-Novoa, M. A., et al, 2020, A Glycosaminoglycan-Rich Fraction From Sea Cucumber *Isostichopus Badionotus* Has Potent Anti-Inflammatory Properties In Vitro And In Vivo, *Nutrients* 12, p. 1698.
 68. Niu, Q., Li, G., Li, C., Li, Q., Li, J., Liu, C., et al, 2020, Two Different Fucosylated Chondroitin Sulfates: Structural Elucidation, Stimulating Hematopoiesis And Immune-Enhancing Effects, *Carbohydr. Polym*, 230, p. 115698.
 69. Ustyuzhanina, N. E., Anisimova, N. Y., Bilan, M. I., Donenko, F. V., Morozevich, G. E., Yashunskiy, D. V., et al, 2021, Chondroitin Sulfate And Fucosylated Chondroitin Sulfate As Stimulators Of Hematopoiesis In Cyclophosphamide- Induced Mice, *Pharmaceuticals* 14, p. 1074.
 70. Wu, M., Wen, D., Gao, N., Xiao, C., Yang, L., Xu, L., et al, 2015, Anticoagulant and Antithrombotic Evaluation of Native Fucosylated Chondroitin Sulfates and Their Derivatives as Selective Inhibitors of Intrinsic Factor Xase, *Eur. J. Medic. Chem*, 92, pp. 257–269.
 71. Yan, L., Wang, D., Zhu, M., Yu, Y., Zhang, F., Ye, X., et al, 2019, Highly Purified Fucosylated Chondroitin Sulfate Oligomers With Selective Intrinsic Factor Xase Complex Inhibition. *Carbohydr. Poly*, 222, p. 115025.
 72. Morya, V. K., Kim, J., & Kim, E. K, 2012, Algal fucoidan: Structural and size-dependent bioactivities and their perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), pp. 71–82.
 73. Dinh Thanh Trung, Duong Khanh Minh, Pham Duc Thinh, 2020, Isolation, chemical compositions and antibacterial activity of glycosaminoglycans from sea cucumber *Holothuria edulis*, *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 20(4B), pp. 289–298.
 74. Ustyuzhanina, N.E.; Bilan, M.I.; Dmitrenok, A.S.; Tsvetkova, E.A.; Nikogosova, S.P.; Hang, C.T.T.; Thinh, P.D.; Trung, D.T.; Van, T.T.T.; Shashkov, A.S.; et al, 2022, Fucose-Rich Sulfated Polysaccharides from Two Vietnamese Sea Cucumbers *Bohadschia argus* and *Holothuria*

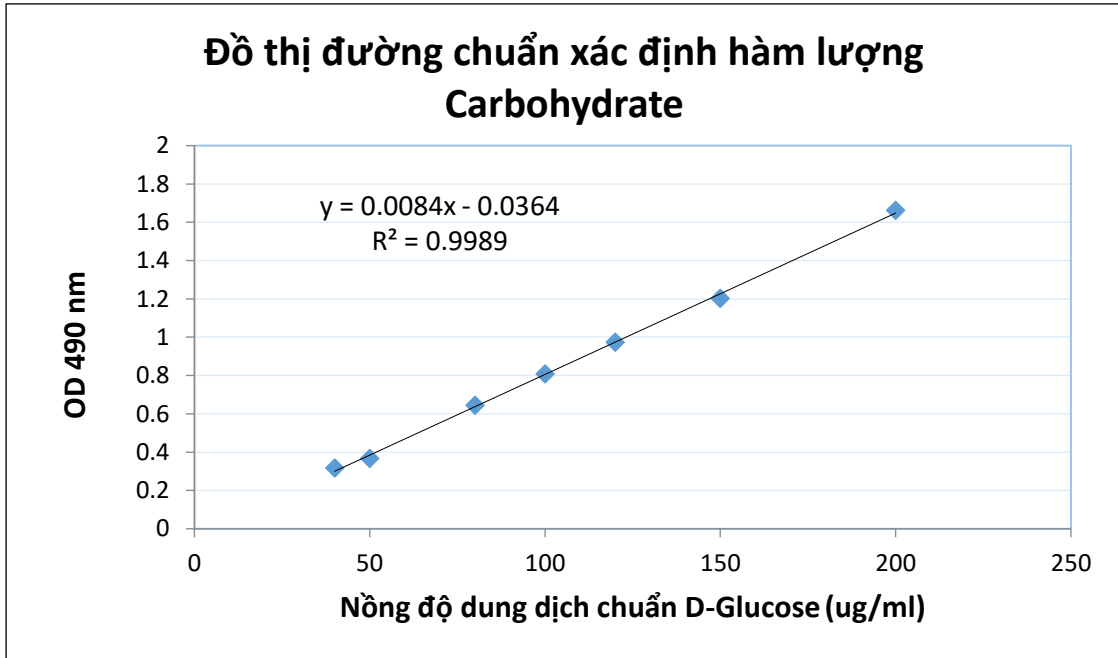
- (Theelothuria) spinifera: Structures and Anticoagulant Activity. *Mar. Drugs*, 20, p. 380.
75. Mai Ngô Thương Hoài, 2019, *Nghiên cứu chiết tách và phân tích đặc trưng cấu trúc của glycosaminoglycan từ hải sâm Holothuria atra*, Luận văn thạc sĩ, Học viện khoa học và công nghệ, Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.
 76. Dương Khánh Minh, 2020, *Xác định thành phần hóa học và đặc điểm cấu trúc của polysaccharide sulfate từ hải sâm Stichopus horrens*, Luận văn thạc sĩ, Học viện khoa học và công nghệ, Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.
 77. Phạm Đức Thịnh, Trần Thanh Huyền, Trần Thị Thanh Vân, Cao Thị Thủy Hằng, Đinh Thanh Trung, Phạm Trung Sơn, 2019, Extraction and structural characteristic of polysaccharide sulfate from sea cucumber *Holothuria spinifera*, *Vietnam Journal of Chemistry*, 57(4E1,2):108-13.
 78. Dodgson K. S., Price R.G., 1962, A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides, *Biochemical Journal*, 84(1), pp. 106 – 110.
 79. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith, F., 1956, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28(3), pp. 350 – 356.
 80. Thermo Scientific, 2013, *Column Product Manual, Dionex CarboPac MA1*
 81. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.I., Randall R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), pp. 265 – 275.
 82. Bitter T., Muir H.M., 1962, A modified uronic acid carbazole reaction, *Analytical Biochemistry*, 4(4), pp. 330 – 334.
 83. Mohamed Ben Mansour, Rafik Balti, Lamia Yacoubi, Véronique Ollivier, Frédéric Chaubet, Raoui Mounir Maaroufi, 2019, Primary structure and anticoagulant activity of fucoidan from the sea cucumber *Holothuria polii*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, pp. 1145 – 1153.

84. Phạm Đức Thịnh, 2015, *Nghiên cứu phân tích thành phần, cấu trúc hóa học của fucoïdan có hoạt tính sinh học từ một số loài rong nâu ở Vịnh Nha Trang*, Luận án tiến sĩ Hóa học, Viện Hóa học, Hà Nội.
85. Chen SG., Xue CH., Yin LA., Tang QJ., Yu GL., Chai WG., 2011, Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers, *Carbohydrate Polymer*, 83(2), pp. 688 – 696.
86. Nahla El-Sayed El-Shazly Omran, 2013, Nutritional value of some Egyptian sea cucumbers, *African Journal of Biotechnology*, 12(35), pp. 5466 – 5472.
87. Wu N.A., Chen S.G., Ye X.Q., Li G.Y., Yin L., Xue C.H., 2014, Identification of fucans from four species of sea cucumber by high temperature ¹H NMR, *Journal of Ocean University of China*, 13(5), pp. 871 – 876.
88. Shuang Song, Sufeng Wu, Chunqing Ai, Xin Xu, Zhenjun Zhu, Chunyang Cao, Jingfeng Yang, Chengrong Wen, 2018, Compositional analysis of sulfated polysaccharides from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) released by autolysis reaction, *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, pp. 420 – 425.
89. Pomin V.H., Paulo A.S.Mourão, 2014, Specific sulfation and glycosylation – A structural combination for the anticoagulation of marine carbohydrates, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(33).
90. Kariya Y., Mulloy B., Imai K., Tominaga A., Kaneko T., Asari A., et al., 2004, Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis, *Carbohydrate Research*, 339(7), pp. 1339 – 1346.
91. Mingyi Wu; Shimin Xu; Jinhua Zhao; Hui Kang; Hui Dingm, 2010, Preparation and characterization of molecular weight fractions of glycosaminoglycan from sea cucumber *Thelenata ananas* using free radical depolymerization, *Carbohydrate Research*, 345, pp. 649 – 655.
92. Pereira M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L., Clark G.F., 1999, Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with

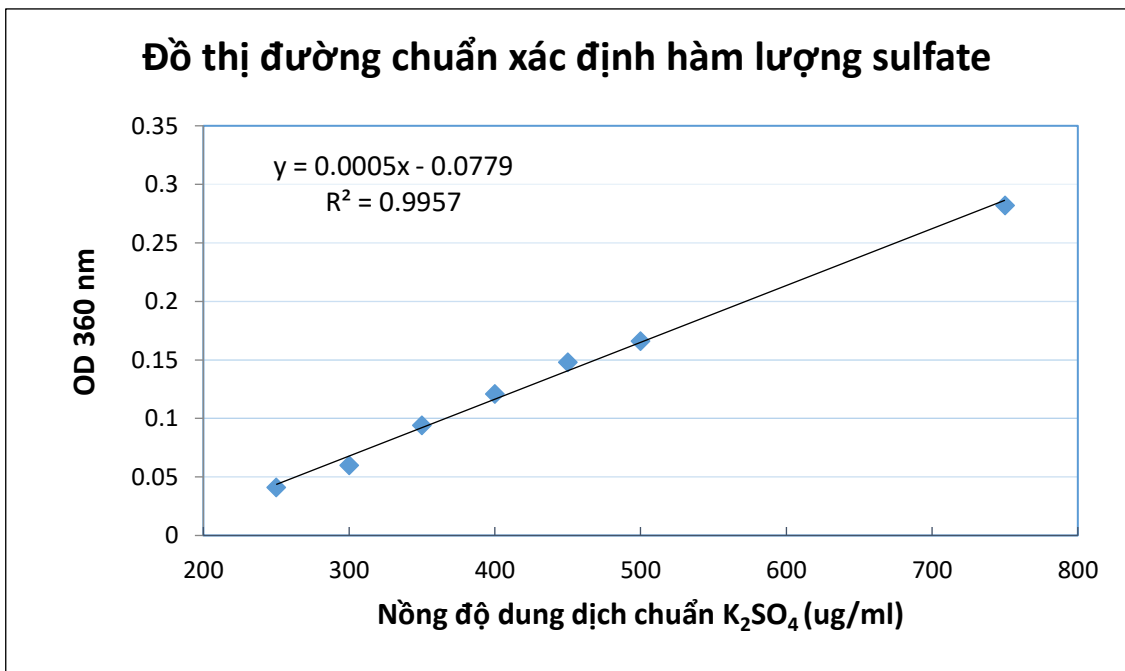
- the more heterogeneous and branched polymers from brown algae, *Journal of Biological Chemistry*, 247(12), pp. 7656 – 7667.
93. Piaopiao Qiu, Fangxia Wu, Lin Yia, Lei Chen, Yongsheng Jin, Xiujuan Ding, Yilan Ouyang, Yiming Yao, Yi Jiang, Zhenqing Zhang, 2020, Structure characterization of a heavily fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber (*H. leucospilota*) with bottom-up strategies, *Carbohydrate Polymers* (240), p. 116337.
 94. Jiaojiao Mou, Cong Wang, Wenjing Li, Jie Yang, 2017, Purification, structural characterization and anticoagulant properties of fucosylated chondroitin sulfate isolated from *Holothuria mexicana*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, pp. 208 – 215.
 95. Liu X., Sun Z., Zhang M., Meng X., Xia X., Yuan W., Xue F., Liu C., 2012, Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus*, *Carbohydrate Polymer*, 90, pp. 1664 – 1670.
 96. Berteau O., Mulloy B., 2003, Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide, *Glycobiology*, 13(6), pp. 29R – 40R.

PHỤ LỤC

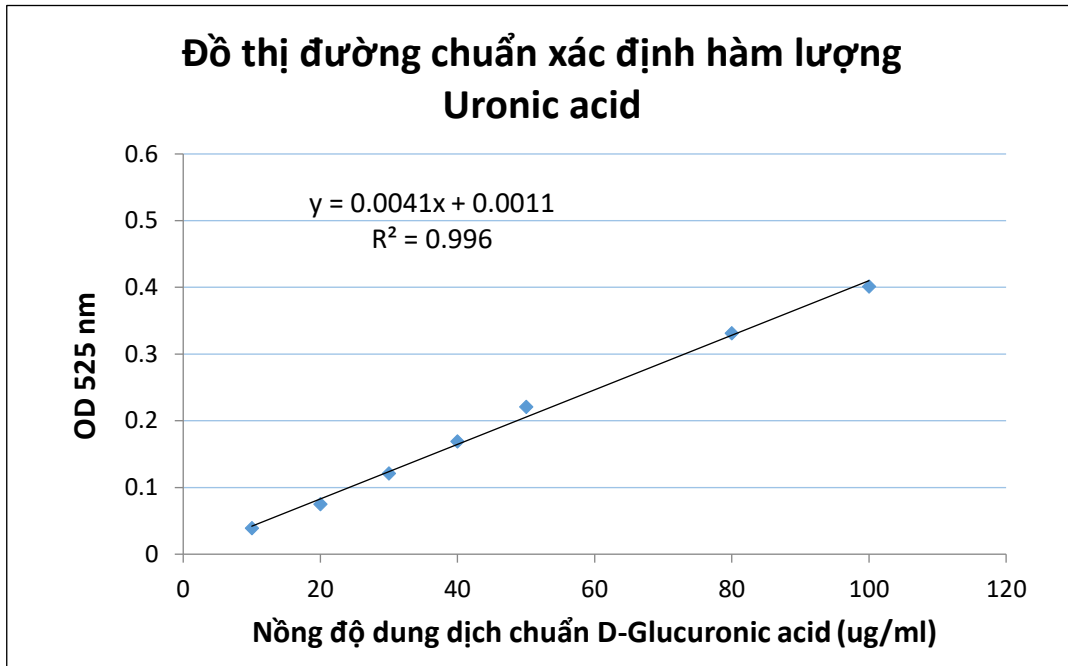
Phụ lục 1: Đồ thị xây dựng đường chuẩn của dung dịch chuẩn D-Glucose trong phân tích hàm lượng carbohydrate mẫu PS dạng thô



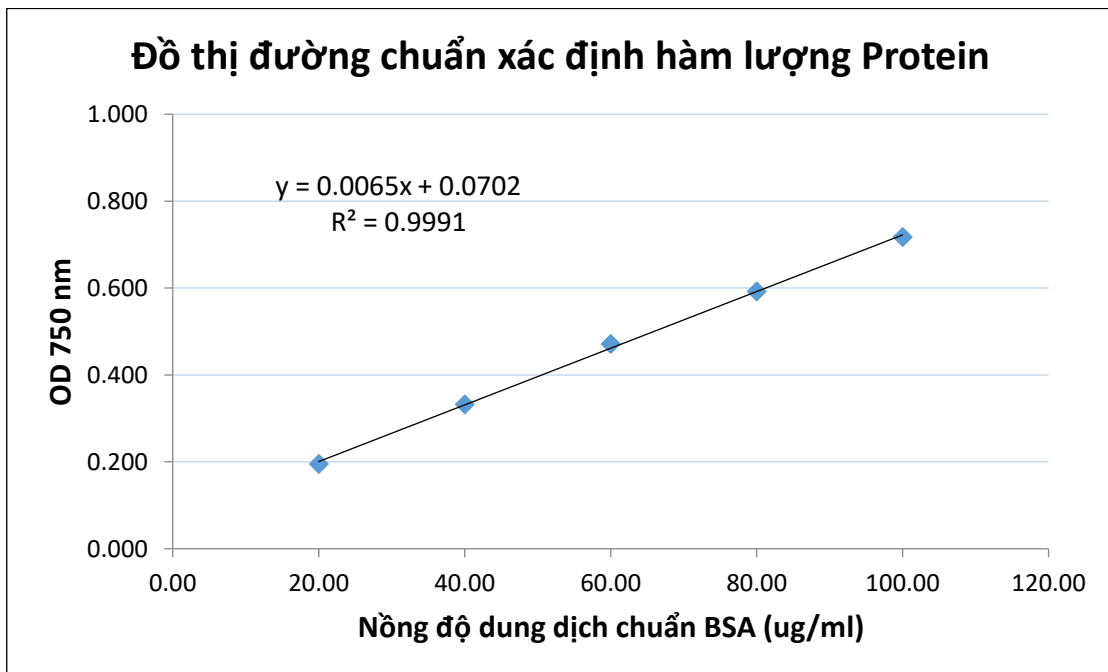
Phụ lục 2: Đồ thị xây dựng đường chuẩn của dung dịch chuẩn K_2SO_4 trong phân tích hàm lượng sulfate mẫu PS dạng thô



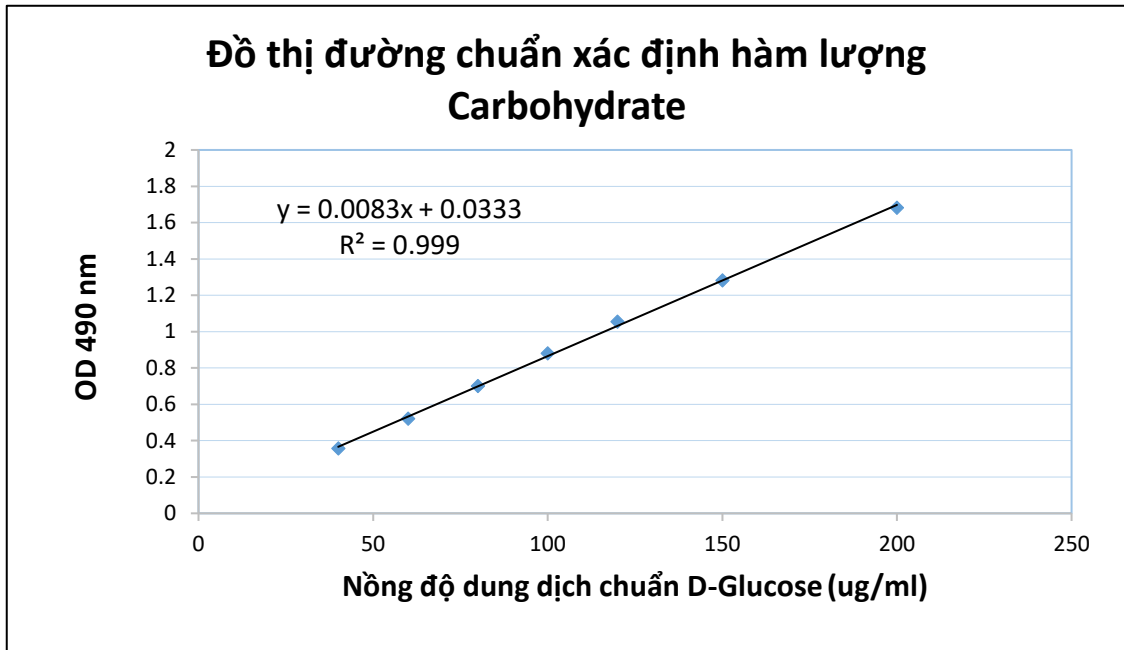
Phụ lục 3: Đồ thị xây dựng đường chuẩn của dung dịch chuẩn D-Glucuronic acid trong phân tích hàm lượng uronic acid mẫu PS dạng thô



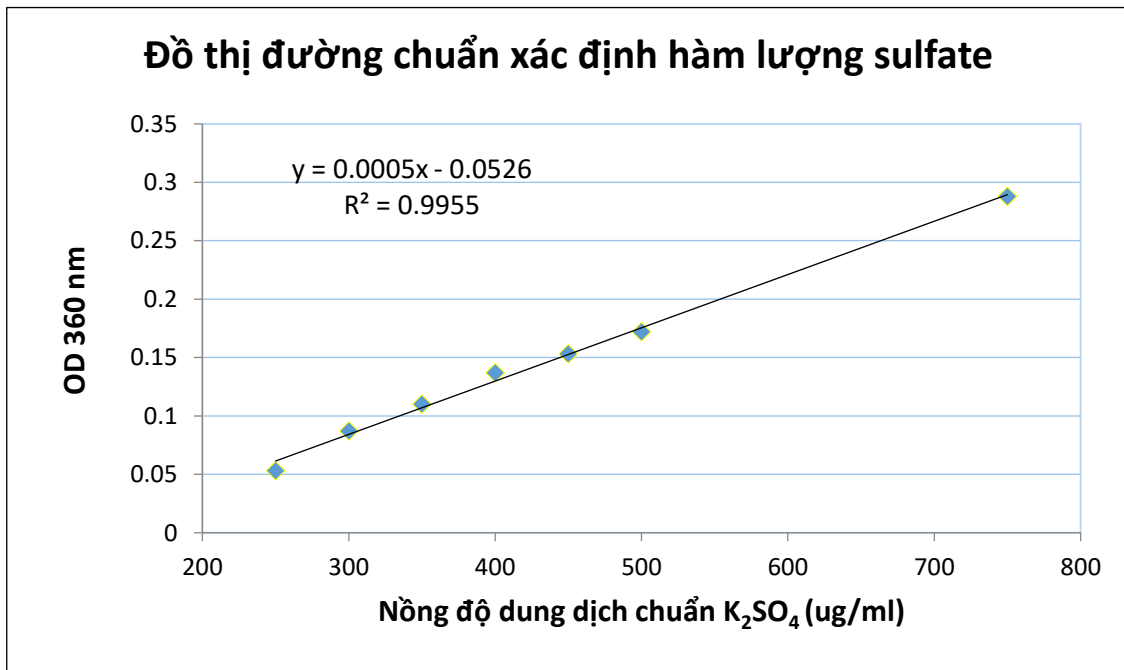
Phụ lục 4: Đồ thị xây dựng đường chuẩn của dung dịch chuẩn BSA trong phân tích hàm lượng protein mẫu PS dạng thô



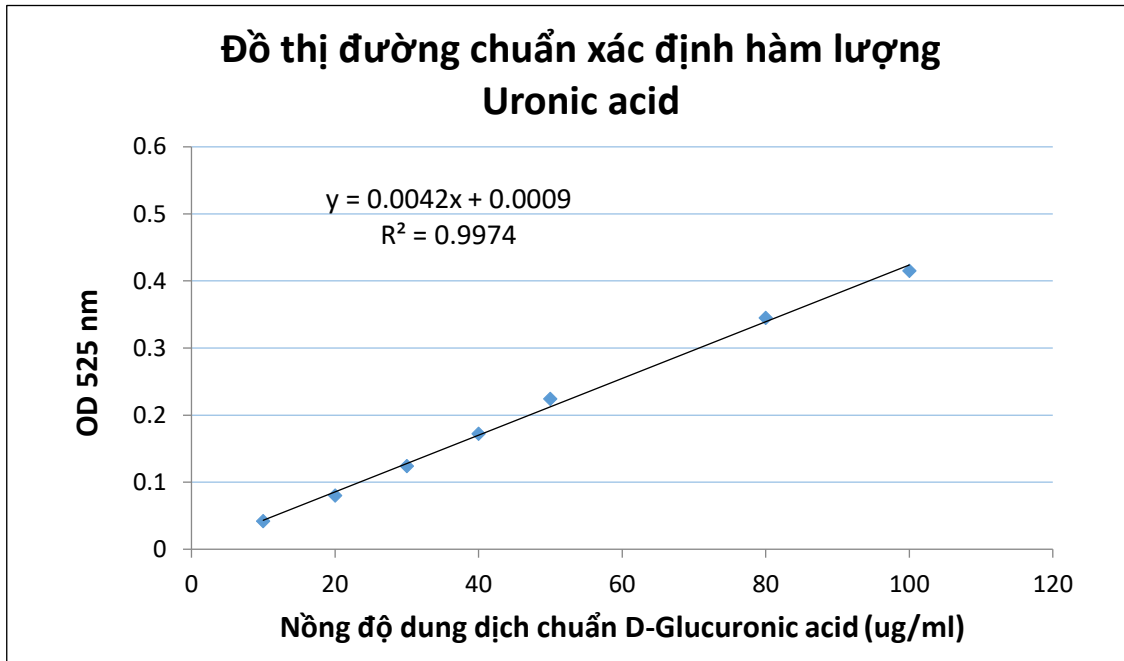
Phụ lục 5: Đồ thị xây dựng đường chuẩn của dung dịch chuẩn D-Glucose trong phân tích hàm lượng carbohydrate các phân đoạn PS



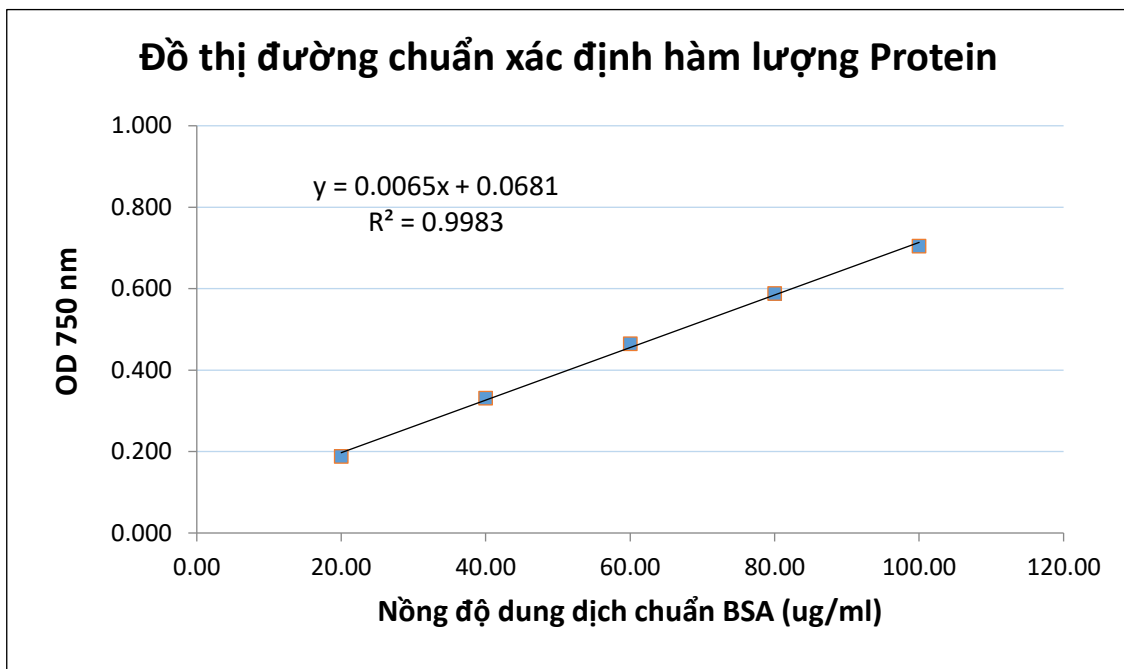
Phụ lục 6: Đồ thị xây dựng đường chuẩn của dung dịch chuẩn K_2SO_4 trong phân tích hàm lượng sulfate các phân đoạn PS



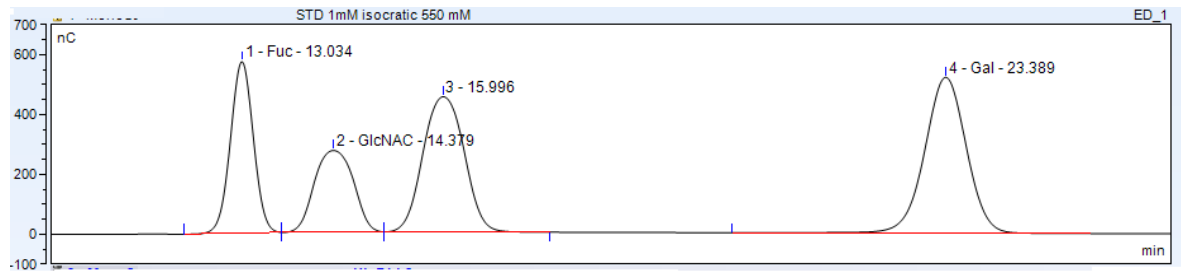
Phụ lục 7: Đồ thị xây dựng đường chuẩn của dung dịch chuẩn D-Glucuronic acid trong phân tích hàm lượng uronic acid các phân đoạn PS



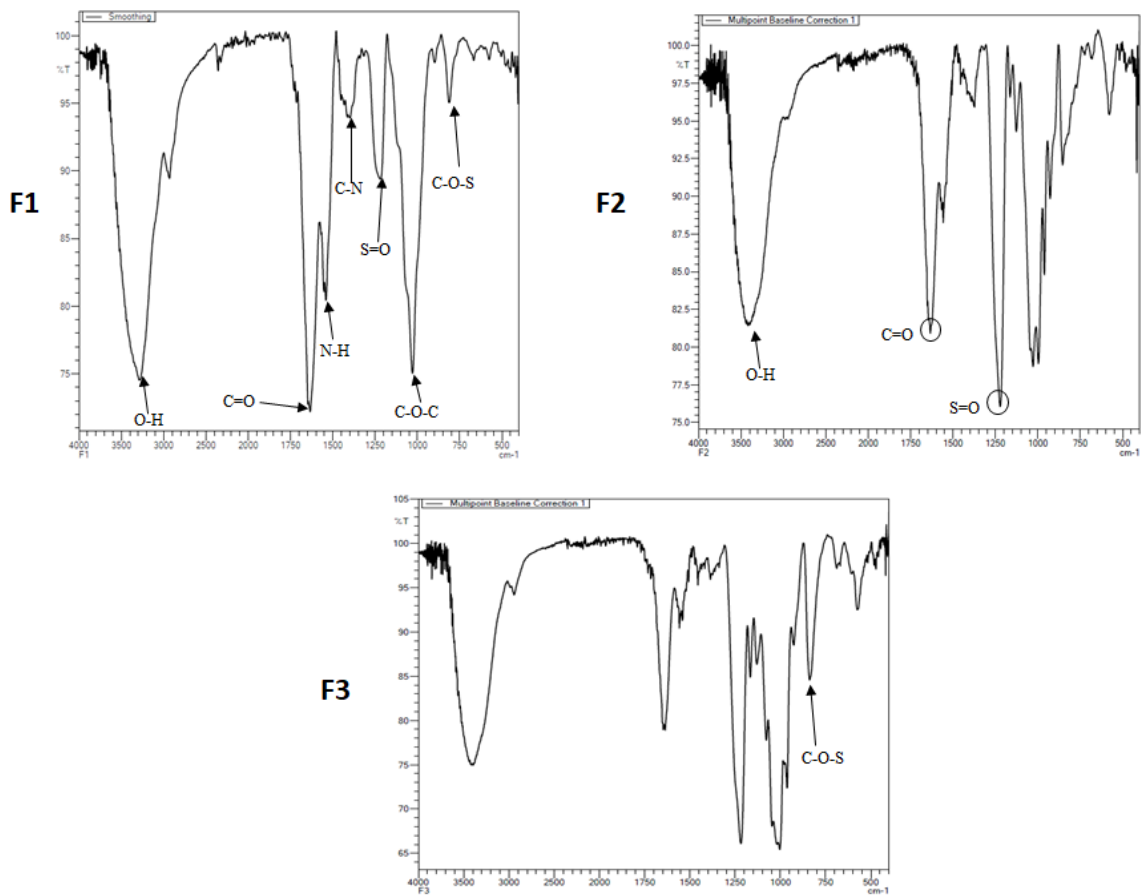
Phụ lục 8: Đồ thị xây dựng đường chuẩn của dung dịch chuẩn BSA trong phân tích hàm lượng protein các phân đoạn PS



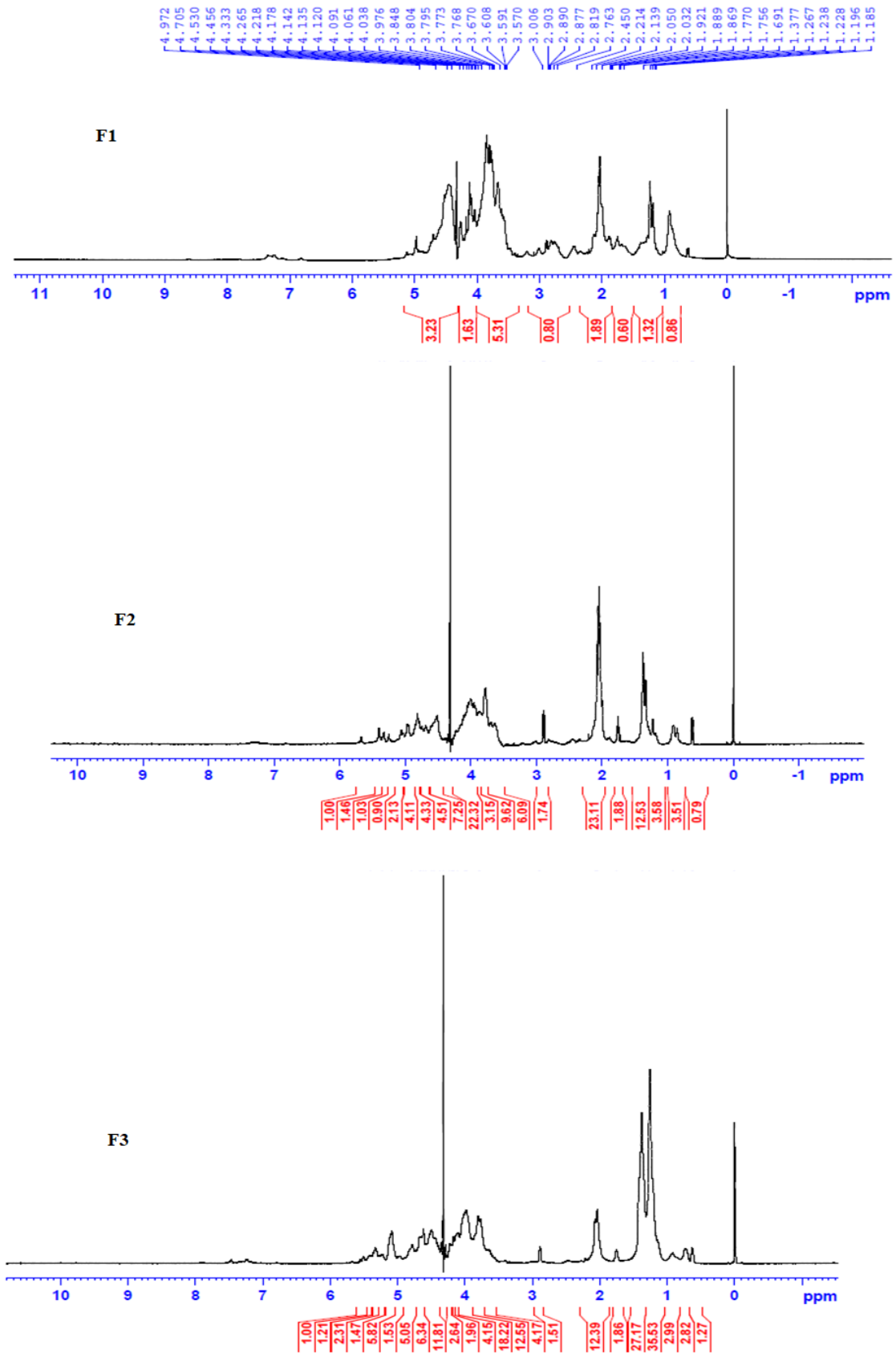
Phụ lục 9: Sắc ký đồ IC của PS dạng thô từ hải sâm *Holothuria leucospilota*



Phụ lục 10: Phổ IR của PS từ hải sâm *Holothuria leucospilota*



Phụ lục 11: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của phân đoạn PS từ hải sâm *Holothuria leucospilota*



Phụ lục 12: Phổ ^{13}C -NMR của phân đoạn PS F2 từ hải sâm *Holothuria leucospilota*

