



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0036656

(51)^{2020.01} A61K 36/02; C08B 37/00

(13) B

(21) 1-2021-03294

(22) 04/06/2021

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/08/2021 401

(73) Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A18, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Thành Thị Thu Thủy (VN); Quách Thị Minh Thu (VN); Đặng Vũ Lương (VN); Ngô Văn Quang (VN); Trần Thị Thanh Vân (VN).

(54) QUY TRÌNH CHIẾT TÁCH FUCOIDAN TRỌNG LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP TỪ RONG NÂU SỬ DỤNG CHẤT LỎNG ION VÀ FUCOIDAN TRỌNG LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tách chiết fucoidan trọng lượng phân tử thấp từ rong nâu theo sáng chế bao gồm các bước:

(i) xử lý tạo bột rong nâu nguyên liệu;

(ii) chiết tách thu fucoidan tự nhiên; và

(iii) xử lý thu fucoidan trọng lượng phân tử thấp.

Sáng chế cũng đề cập đến fucoidan trọng lượng phân tử thấp thu được từ quy trình này. Fucoidan trọng lượng phân tử thấp này có hoạt tính cao hơn so với fucoidan tự nhiên và có tiềm năng lớn để ứng dụng sản xuất thực phẩm chức năng và thực phẩm bổ sung cho người.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình chiết tách fucoidan trọng lượng phân tử thấp từ rong nâu sử dụng chất lỏng ion. Fucoidan trọng lượng phân tử thấp thu được từ quy trình theo sáng chế có hoạt tính cao hơn so với fucoidan tự nhiên và có tiềm năng lớn để ứng dụng sản xuất thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung cho người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Rong biển hay rong bẹ hay cỏ biển là loài thực vật sinh sống ở biển, thuộc nhóm rong biển. Rong biển có thể sống ở cả hai môi trường nước mặn và nước lợ, chúng mọc trên các rạn san hô hoặc trên các vách đá, hoặc có thể mọc dưới tầng nước sâu với điều kiện có ánh sáng mặt trời chiếu tới để quang hợp. Trên thế giới, các nhà khoa học đã xác định được khoảng 10.000 loài rong biển, chia thành 3 ngành dựa vào sắc tố của chúng (Carpenter, K.E.; Niem, V.H. (1998), Vol. 1. Rome, FAO, 1-686), bao gồm: Rong đỏ khoảng 6.500 loài; Rong nâu khoảng 1.800 loài; Rong lục khoảng 1.500 loài. Thành phần hóa học của rong biển bao gồm lipid, protein, peptit, polysacarit, carotenoid, các hợp chất phenolic, alkaloid,... Các nghiên cứu về giá trị dinh dưỡng của rong biển (Berna Kılınç, Semra Cirik, Gamze Turan, et al. (2013). Food Industry, Edited by Innocenzo Muzzalupok; Ruperes, P. (2002), Food Chemistry, 79, pp. 23-26) cho thấy rong biển rất giàu dưỡng chất. Ngoài thành phần đậm cao, rong biển còn chứa rất nhiều khoáng chất, các yếu tố vi lượng trong đó nổi bật là iod, các vitamin A, E, C, B12, B1 và chất xơ.

Fucoidan là một polysacarit sulfat hóa nằm trong thành tế bào của rong nâu. Trong rong nâu, fucoidan chiếm hàm lượng khoảng 0,6 - 8% trọng lượng khô phụ

thuộc vào loài rong, vị trí địa lý nơi rong sinh trưởng, thời gian thu hoạch rong và đặc biệt vào phương pháp chiết tách. Để chiết được fucoidan thì cần phải phá vỡ thành tế bào rong nâu. Hiện nay có thể chia các phương pháp chiết tách fucoidan thành 2 loại: i) Phương pháp truyền thống: Chiết bằng nước nóng hoặc axit (Olesya S. V., Svetlana P. E, Tatyana N. Z. (2011), *Carbohydrate Research*. 346, pp.2769-2776; Seng Joe Lim, Wan Mustapha Wan Aida, Editor(s): Jayachandran Venkatesan, Sukumaran Anil, Se-Kwon Kim, Elsevier, 2017, pp.27-46), đã có các công bố sáng chế của Nga (WO 2005/014657), Mỹ (US6573250B2), châu Âu (EP0645143A1) liên quan đến chiết tách fucoidan bằng phương pháp này. Ưu điểm của phương pháp này là đơn giản, dễ thực hiện, tuy nhiên, nó cũng có nhiều hạn chế như thời gian chiết thường kéo dài tới 5 giờ) và/hoặc ở nhiệt độ khá cao $85\div 90^{\circ}\text{C}$. ii) Phương pháp hiện đại: Chiết bằng enzym (Thuan T. Nguyen, Maria D. Mikkelsen, Vy H. N. Tran, et al. (2020), *Mar. Drugs*, 18, 296) hay có sự hỗ trợ của sóng siêu âm (My Phan, Sung Vo, Tran Dat et al. (2020), *ChemistrySelect*. 5. pp.4371-4380), vi sóng (Rodriguez-JassoRosa, Mussatto Solange, Pastrana Lorenzo et al. (2011). *Carbohydrate Polymers*. 86, pp. 1137-1144). Các phương pháp trên có ưu điểm hơn so với phương pháp chiết nước thông thường là làm giảm thời gian chiết, dung môi chiết, cũng như nhiệt độ chiết và đạt hiệu suất cao hơn (Dobrinčić A, Balbino S, Zorić Z, et al. (2020). *Mar Drugs*. 18(3), 168). Tuy vậy, hạn chế của phương pháp này là phải sử dụng loại enzym phù hợp để chiết, nếu dùng sự hỗ trợ sóng siêu âm hay vi sóng thì ngoài đòi hỏi thiết bị chuyên dụng thì việc chiết tách trong thời gian dài có thể phá vỡ cấu trúc của fucoidan làm ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của fucoidan. Chất lỏng ion là một loại muối nóng chảy ở nhiệt độ thường. Chúng được xem như là các “dung môi xanh” tiềm năng bởi có áp suất hơi không đáng kể, khi so sánh với các dung môi hữu cơ dễ bay hơi, và do đó, hiện được chú trọng nghiên cứu ứng dụng trong hóa học xanh và công nghệ sạch (Endres F. and Abedin S.Z.E., *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2006, 8, pp.2101-2116). Chất lỏng ion đã được sử dụng như là dung môi hữu cơ

dùng để tách và làm sạch các chất khác nhau như axit béo từ dầu đậu nành, axit shikimic từ lá cây *Ginkgo biloba*, lacton từ *Ligusticum chuanxiong*, tanin từ thực vật (Manic M.S., Visak V.N., Ponte M.N.D. et al. (2011), *AIChE Journals*, 57, pp. 1377-1355; Usuki T., Yasuda N., Fujita M.Y et al.. (2011), *Chemical Communication*, 47, pp. 10560-10562; Chowdhury S.A., Vijayaraghavan R. and MacFarlane D.R. (2010), *Green Chemistry*, 12, pp.1023-1028). Không chỉ có khả năng tách chiết các chất xenluloza, hemixenluloza và lignin từ gỗ mà chất lỏng ion cũng đã được sử dụng để tách chiết thành công một số loại polyme sinh học (keratin, pectin, chitin và suberin) từ các nguồn khác nhau (Wang Y.X. and Cao X.J. (2012), *Process Biochemistry*, 47, pp. 896-899; Qin Y., Lu X., Sun N. et al. (2010), *Green Chemistry*, 12, pp.968-971). Trong vài năm trở lại đây đã có các nghiên cứu ban đầu về sử dụng chất lỏng ion để tách một số hợp chất có giá trị từ rong biển. Đặc biệt là nghiên cứu của nhóm tác giả Nhật Bản (Fujita K., Kobayashi D., Nakamura N. et al. (2013). *Enzyme Microbial Technology*, 52, pp.199-202) đã xác nhận khả năng hòa tan rong biển bằng chất lỏng ion mà không cần cung cấp nhiệt đã mở ra khả năng ứng dụng chất lỏng ion trong chế biến rong biển. Sáng chế này liên quan đến sử dụng chất lỏng ion trong chiết tách fucoidan từ rong nâu, tăng được hiệu suất chiết tách. Đây là lần đầu tiên chất lỏng ion được sử dụng trong quy trình chiết tách fucoidan từ rong nâu.

Fucoidan có hoạt tính sinh học rất phong phú, nó có nhiều hoạt tính sinh học quý báu như hoạt tính chống khối u, hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, chống đông tụ máu và hoạt tính chống lại các virus như HIV (Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Dmitrenok P.S. et al. (2012). *Carbohydr. Polym.*, 87, pp.186–194; Baba M., Snoeck R., Pauwels R. et al. (1988). *Antimicrob Agents Chemother* 32, pp.1742- 1745). Ngoài ra, fucoidan còn được mô tả có nhiều tác dụng sinh học lý thú khác như tác dụng hạ cholesterol, giảm mỡ máu, giảm LDL-cholesterol, triglycerit máu, tăng HDL-cholesterol, ức chế miễn dịch nên có

thể sử dụng fucoidan trong các trường hợp ghép phủ tạng ... (Huang L., Wen K., Gao X. et al. (2010). Pharm Biol, 48, pp.422–426; Aisa Y., Miyakawa Y., Nakazato T., et al. (2005). Am J. Hematol 78, pp.7-14; Maruyama H., Tamauchi H., Hashimoto M. et al. (2003). *In vivo*, 17(3), pp.245-249). Fucoidan làm tăng khả năng sản xuất các dạng interleukin và interferon được tiết ra nhờ các tế bào miễn dịch giống tế bào T. Nói cách khác, fucoidan tăng cường việc sản xuất interleukin và interferon, kích hoạt các tế bào miễn dịch khác nhau (T cells, NK cells và macrophage-đại thực bào) cần thiết để phòng nhiễm khuẩn và bệnh tật. Fucoidan tìm thấy trong rong nâu làm tăng đáng kể việc sản xuất một chất được gọi IT-IGF hoặc HGF. Phòng thí nghiệm nghiên cứu Công nghệ sinh học ở Nhật, đã nghiên cứu cấu tạo xơ của một vài loại rong, trong khi tiến hành các nghiên cứu này họ đã phát hiện ra rằng F-fucoidan tìm thấy trong nhiều loài rong nâu có thể làm tăng đáng kể việc sản xuất HGF. HGF là một cytokin rất đặc biệt, nó là một protein làm chậm quá trình lão hóa, không chỉ kích thích việc tái tạo các tế bào gan mà đồng thời còn tăng cường việc sản xuất các tế bào da, tế bào cơ tim, sụn. Các nghiên cứu cho thấy HGF thực hiện một tổ hợp rộng các chức năng sinh hóa và được coi là quan trọng để tạo thành sẹo và phục hồi các mô cơ thể. HGF có thể ngăn chặn viêm gan, điều trị xơ gan, liệt gan, xơ hóa phổi và làm chậm quá trình già hóa. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, fucoidan có tác dụng thúc đẩy các tế bào ung thư tự chết theo chương trình (apoptosis) và tiêu diệt các khối u đại thực bào. Một số fucoidan, đặc biệt là fucoidan từ loài rong *Fucus vesiculosus* có thể ức chế hình thành mạch máu mới bằng cách gắn các yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu và yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi cơ bản với các thụ thể tương ứng của nó (Fitton J. H. (2011). Mar. Drugs, 9, pp.1731–1760). Ngoài ra, nghiên cứu sâu hơn đã phát hiện fucoidan có khả năng ngăn chặn một số loại viêm nguy hiểm xuất hiện trong màng não, một biến chứng nguy hiểm của viêm do virus và vi khuẩn. Phát hiện này cùng những nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng fucoidan làm được những việc mà ít thuốc nào có thể có công dụng như vậy, đó là diệt vi khuẩn trong khi đó lại tăng cường hệ miễn

dịch (Marudhupandi T., Kumar T.T.A. et al., (2013), International Current Pharmaceutical Journal, 2(10), pp.156-158). Những nghiên cứu trong suốt thập niên vừa qua đã đưa ra số lượng lớn bằng chứng khoa học về những lợi ích sức khỏe của fucoidan, mở ra những cơ hội tiềm năng cho ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm dinh dưỡng, mỹ phẩm và thực phẩm chức năng.

Tuy nhiên, sự hấp thụ các polysacarit nói chung và fucoidan nói riêng hiện nay vẫn còn là một vấn đề gây tranh cãi. Fucoidan tự nhiên có trọng lượng phân tử lớn và cấu trúc không gian phức tạp, rất khó để xác định chính xác cấu trúc hóa học và các nghiên cứu định lượng hiện nay vẫn còn khó khăn, do vậy cản trở việc phát triển của fucoidan thành thuốc. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy fucoidan trọng lượng phân tử thấp có thể có hoạt tính cao hơn và dễ hấp thu hơn khi đi vào cơ thể người. Fucoidan trọng lượng phân tử thấp thu được từ *Ascophyllum nodosum* bằng thủy phân axit có khối lượng là 3.090 Da, có hoạt tính chống đông tụ máu cao hơn mẫu tự nhiên (Marais M.F. and Joseleau J.P. (2001). Carbohydrate Research, 336 (2), pp. 155-159). Các nghiên cứu về fucoidan từ rong nâu *Laminaria Japonica* (Li, D.Y.; Xu, Z.; Huang, L.M.; et al. (2001). Food Sci., 22, pp. 92-95; Li D.Y.; Xu Z.; Zhang S.H. (1999). Food Sci., 20, pp. 45-46; Fu X.Y.; Xue C.H.; Ning Y et al (2004). J. Ocean Univ. Qingdao, 34, pp. 560-564) cho thấy fucoidan với trọng lượng phân tử thấp ($M_w = 8.000$ Da) có khả năng làm giảm rõ rệt lipid máu của chuột thí nghiệm so với fucoidan tự nhiên. Fucoidan oligosacarit cho thấy tác dụng hạ huyết áp tốt trên chuột huyết áp cao. Yang và cộng sự (Chen Yang, Donghwa Chung, Il-Shik Shin, et al. (2008), International Journal of Biological Macromolecules, 43, pp. 433-437) đã nghiên cứu ảnh hưởng của trọng lượng phân tử của fucoidan từ *Undaria pinnatifida* đến hoạt tính chống ung thư, kết quả cho thấy khi giảm trọng lượng phân tử bằng cách thủy phân với axit thì hoạt tính chống ung thư tăng lên 75,9%. US 20080089941 A1 đã đề cập đến thủy phân fucoidan

nhằm tạo fucoidan trọng lượng phân tử thấp để sử dụng như một chất bổ sung cho chế độ ăn uống hoặc sử dụng như một sản phẩm chăm sóc da.

So với các nước vùng Đông Nam Á, Việt Nam có nguồn rong biển đa dạng và phong phú với tổng số gần 1000 loài, trong đó khoảng 250 loài rong nâu phân bố rộng khắp ven biển và các đảo với sản lượng khai thác ước tính đạt khoảng 10.000 tấn tươi/năm. Mức độ khai thác hàng năm chỉ đạt khoảng 2 - 5% trữ lượng tự nhiên, năm nào khai thác nhiều nhất mới chỉ đạt 25 - 30%. (Huynh Q. N and Nguyen H. D. (1998) The seaweed resources of Vietnam, A.T Critchley, M. Ohno. Seaweed resources of the World. pp.62-69; Tu Van Nguyen, Nhu Hau Le, Showe-Mei Lin et al. Botanica Marina (2013), 56(3), pp.207–227). Do đó, để có thể sử dụng một cách hiệu quả nguồn tài nguyên rong biển của Việt Nam, cần phải có các nghiên cứu về fucoidan trên đối tượng rong sinh trưởng ở các khu vực sinh thái khác nhau của biển Việt Nam.

Hiện nay Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu về chiết tách cũng như đánh giá khả năng ứng dụng làm dược phẩm của fucoidan, có một số sản phẩm fucoidan thương mại đã đưa ra thị trường. Ví dụ, các sản phẩm thực phẩm chức năng mà thành phần có fucoidan tự nhiên chiết tách từ rong nâu hỗ trợ điều trị ung thư dựa trên kết quả nghiên cứu của Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang-Viện Hàn Lâm KHCN Việt Nam và Viện Khoa học Vật liệu-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu về fucoidan trọng lượng phân tử thấp định hướng làm thực phẩm chức năng trên đối tượng rong biển Việt Nam. Kết quả là chưa có sản phẩm thương mại sử dụng fucoidan trọng lượng phân tử thấp. Do đó, rất cần có các quy trình điều chế fucoidan trọng lượng phân tử thấp từ rong nâu tự nhiên để sản xuất thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung cho người với hiệu quả cao trên cơ sở khai thác nguồn nguyên liệu rong nâu tại Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình tách chiết fucoidan trọng lượng phân tử thấp từ rong nâu làm thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung cho người hiệu quả cao.

Quy trình theo sáng chế sử dụng chất lỏng ion để phá vỡ thành tế bào rong nâu, giúp cho hiệu quả chiết tách fucoidan có trong thành tế bào rong nâu được cao hơn. Trong đó, quy trình theo sáng chế đề xuất tỷ lệ tối ưu cho việc sử dụng chất lỏng ion cho nguyên liệu rong nâu, để đảm bảo cả về mặt kinh tế và hiệu suất.

Quy trình tách chiết fucoidan trọng lượng phân tử thấp từ rong nâu theo sáng chế bao gồm các bước:

- (i) xử lý tạo bột rong nâu nguyên liệu;
- (ii) chiết tách thu fucoidan tự nhiên; và
- (iii) xử lý thu fucoidan trọng lượng phân tử thấp.

Quy trình sử dụng chất lỏng ion để chiết tách fucoidan đề cập đến trong sáng chế này áp dụng có hiệu quả cho tất cả các loài rong nâu.

Trong sáng chế này tỷ lệ tối ưu của chất lỏng ion so với rong cũng như công đoạn tiền xử lý rong với chất lỏng ion trong quy trình chiết tách đã được xác định để thu được fucoidan với hiệu suất cao.

Trong sáng chế này hiệu suất chiết tách fucoidan có trọng lượng phân tử thấp cao hơn hẳn so với phương pháp chiết thông thường. Vì vậy, sáng chế này có tiềm năng cao khi áp dụng ở quy mô công nghiệp.

Fucoidan trọng lượng phân tử thấp thu được từ quy trình theo sáng chế có hoạt tính cao hơn so với fucoidan tự nhiên và có tiềm năng lớn để ứng dụng sản xuất thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung cho người.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện kết quả đo GPC của mẫu fucoidan trọng lượng phân tử thấp (M).

Hình 2 thể hiện phổ IR của mẫu fucoidan trọng lượng phân tử thấp (M).

Hình 3 thể hiện phổ ^1H NMR của mẫu fucoidan trọng lượng phân tử thấp (M).

Hình 4 là hình ảnh tế bào ung thư sau khi đã xử lý với mẫu fucoidan trọng lượng phân tử thấp (M).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đã tận dụng được nguồn nguyên liệu rong nâu có trữ lượng sinh khối lớn trong tự nhiên của Việt Nam.

Quy trình chiết tách fucoidan trọng lượng phân tử thấp theo sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết dưới đây.

Quy trình chiết tách fucoidan trọng lượng phân tử thấp từ rong nâu sử dụng chất lỏng ion bao gồm các bước:

(i) xử lý tạo bột rong nâu nguyên liệu:

Rong nâu sau khi thu thập về được rửa sạch rác, cát và mùn bằng nước rồi đem phơi khô trong bóng râm, sau đó nghiền mịn thành bột mịn, thu bột rong nâu. Việc thực hiện nghiền rong nâu có thể áp dụng các phương pháp nghiền thông thường được sử dụng trong lĩnh vực, tùy theo điều kiện thực tế.

Chuẩn bị hỗn hợp dung môi hữu cơ theo tỷ lệ $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{Cl} : \text{H}_2\text{O}$ là 4:2:1 (v/v). Thực hiện loại chất màu, loại béo và các chất hữu cơ có khối lượng phân tử thấp khỏi bột rong nâu bằng cách ngâm bột rong nâu trong hỗn hợp dung môi hữu cơ nêu trên theo tỷ lệ bột rong nâu:hỗn hợp dung môi hữu cơ là 1:20 (khối lượng/thể tích), khuấy đều, ngâm ở nhiệt độ phòng qua đêm.

Hỗn hợp sau khi để qua đêm được lọc gạn thu bột rong nâu để hong khô, sau đó sấy đến khối lượng không đổi, thu bột rong nâu nguyên liệu.

(ii) chiết tách thu fucoidan tự nhiên:

Ngâm qua đêm bột rong nâu nguyên liệu trong chất lỏng ion 1-butyl 3-methylimidazolium clorua ($[\text{Bmim}][\text{Cl}]$) theo tỷ lệ bột rong nâu nguyên liệu:chất lỏng ion là 1:15 (khối lượng:thể tích). Việc ngâm bột rong nâu nguyên liệu trong chất lỏng ion giúp phá vỡ thành tế bào rong nâu giúp cho việc chiết xuất fucoidan nằm trong thành tế bào rong nâu được triệt để.

Loại chất lỏng ion được lựa chọn là 1-butyl 3-methylimidazolium clorua ($[\text{Bmim}][\text{Cl}]$) do 1-butyl 3-methylimidazolium clorua là chất có khả năng hòa tan rất tốt xenluloza do việc hình thành cầu hydro giữa proton H^+ của nhóm OH của xenluloza và ion Cl^- của chất lỏng ion. Mà bản chất của việc phá vỡ thành tế bào rong nâu chính là sự hòa tan xenluloza trong thành tế bào. Một lý do nữa là 1-butyl 3-methylimidazolium clorua có độ nhớt thấp dễ dàng hòa tan trong nước.

Tiến hành chiết ở 85°C trong 3 giờ có khuấy, thêm vào dung dịch chiết nước cất nóng theo tỷ lệ nước cất nóng:chất lỏng ion là 1:10 (thể tích:thể tích) và khuấy cho đến khi dung dịch đồng nhất. Lọc lấy dịch chiết, ly tâm lấy dịch trong. Thêm CaCl_2 vào dịch chiết với tỉ lệ 1g/1L, khuấy đều đến khi CaCl_2 được hòa tan hoàn toàn rồi để ở nhiệt độ 40°C qua đêm để loại bỏ alginat là 1 loại polysaccharit khác có trong rong nâu. Ly tâm lấy dịch trong, cô quay áp suất giảm đến khi thể tích còn khoảng bằng thể tích chất lỏng ion ban đầu, mục đích của việc này để tiết kiệm

lượng còn dùng để kết tủa fucoidan ở bước sau, để nguội đến nhiệt độ phòng rồi thêm tiếp còn 96° vào để kết tủa fucoidan với tỷ lệ thể tích là còn:dịch là 3:1, khuấy đều rồi để lắng. Gạn lọc rồi ly tâm thu được fucoidan thô, rửa nhiều lần bằng còn 96°. Fucoidan thu được màu nâu, được sấy tủa ở nhiệt độ 50°C đến khối lượng không đổi thu được fucoidan tự nhiên.

(iii) xử lý thu fucoidan trọng lượng phân tử thấp:

Hòa tan fucoidan tự nhiên trong HCl 0,1N theo tỷ lệ 20 mg fucoidan/1 mL dung dịch axit, sau đó đun nóng tại 85°C trong 30 phút. Fucoidan tự nhiên bị thủy phân bẻ gãy mạch phân tử trong môi trường axit thành fucoidan có trọng lượng phân tử thấp. Dung dịch được trung hòa bằng NaOH 0,1N, thẩm tách bằng màng 10kDa để loại bỏ các phân tử bé có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 10kDa, đông khô để thu được mẫu fucoidan trọng lượng phân tử thấp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chiết tách fucoidan trọng lượng phân tử thấp từ nguyên liệu rong nâu

Rong nâu *Turbinaria decurensthu* thập ở biển Phú Quốc, Kiên Giang. Cân chính xác khoảng 10g bột rong bằng cân phân tích cho vào cốc thủy tinh. Thêm 200ml hỗn hợp dung môi hữu cơ CH₃OH:CH₃Cl:H₂O (4 : 2 : 1, v/v) vào cốc đã chứa bột rong, khuấy đều, rồi ngâm ở nhiệt độ phòng qua đêm. Hỗn hợp sau khi để qua đêm được lọc gạn và rong để hong khô sau đó sấy đến khối lượng không đổi, nghiền nhỏ thành bột. Mẫu bột rong này được sử dụng để chiết tách fucoidan.

Ngâm qua đêm bột rong nâu nguyên liệu trong 150 ml chất lỏng ion 1-butyl 3-methylimidazolium clorua ([Bmim][Cl]). Tiến hành chiết ở 85°C trong 3 giờ có khuấy, thêm vào dung dịch chiết 15 ml nước cất nóng và khuấy cho đến khi dung dịch đồng nhất. Lọc lấy dịch chiết, ly tâm lấy dịch trong. Thêm CaCl₂ vào dịch chiết với tỉ lệ 1g/1L, khuấy đều đến khi CaCl₂ được hòa tan hoàn toàn rồi để ở nhiệt

độ 40°C qua đêm. Ly tâm lấy dịch trong, cô quay áp suất giảm đến khi thể tích còn khoảng bằng thể tích chất lỏng ion ban đầu, để nguội đến nhiệt độ phòng rồi thêm tiếp cồn 96° vào để kết tủa fucoidan với tỷ lệ thể tích là cồn:dịch là 3:1, khuấy đều rồi để lắng. Gạn lọc rồi ly tâm thu được fucoidan thô, rửa nhiều lần bằng cồn 96°. Fucoidan thu được màu nâu, được sấy tủa ở nhiệt độ 50°C đến khối lượng không đổi thu được fucoidan tự nhiên. Xác định trọng lượng phân tử, fucoidan tự nhiên (kí hiệu là Ftd) thu được này có trọng lượng phân tử là 465.000g/mol.

Khối lượng fucoidan tự nhiên thu được sau bước này là 0,41 g, đạt hiệu suất chiết tách là 4,1% (% so với trọng lượng bột rong nâu nguyên liệu).

Fucoidan tự nhiên được hòa tan trong HCl 0,1N, sau đó đun nóng tại 85°C trong 30 phút, dung dịch được trung hòa bằng NaOH 0,1N, thẩm tách bằng màng 10 kDa, đông khô để thu được mẫu fucoidan trọng lượng phân tử thấp (kí hiệu là M) với trọng lượng phân tử là 96.000g/mol thấp hơn đến 4,89 lần so với fucoidan tự nhiên ban đầu.

Mẫu M được nghiên cứu đặc trưng cấu trúc dựa vào 3 phương pháp sắc ký thẩm thấu gel GPC, phổ hồng ngoại IR và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR. Phổ hồng ngoại IR: Phổ hồng ngoại được đo trên máy FT-IR Affinity-1S SHIMADZU.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR: Phổ NMR đo trên máy Bruker AVANCE Neo 600MHz với dung môi D₂O ở nhiệt độ 70°C, sử dụng DSS làm chất chuẩn nội với kỹ thuật đo khử tín hiệu của nước

Kết quả đo GPC (Hình 1) cho thấy mẫu M có trọng lượng phân tử trung bình $M_w = 96.000$ g/mol và sự phân bố trọng lượng phân tử trung bình $M_w/M_n = 1,63$.

Phổ IR: Phổ IR của mẫu M (Hình 2) thể hiện các dải hấp thụ đặc trưng cho fucoidan.

Phổ ^1H NMR của mẫu M (Hình 3) thể hiện các tín hiệu cộng hưởng đặc trưng cho fucoidan.

Ví dụ 2: Thử nghiệm xác định tỷ lệ chất lỏng ion 1-butyl 3-methylimidazolium clorua ([Bmim][Cl]) tối ưu

Để thực hiện việc xác định tỷ lệ chất lỏng ion 1-butyl 3-methylimidazolium clorua ([Bmim][Cl]) tối ưu để thực hiện bước chiết thu fucoidan tự nhiên từ bột rong nâu, thực hiện ngâm qua đêm bột rong nâu nguyên liệu trong chất lỏng ion 1-butyl 3-methylimidazolium clorua([Bmim][Cl]) theo các tỷ lệ 1:5, 1:10, 1:15 và 1:20 (khối lượng:thể tích). Tiến hành chiết ở 85°C trong 3 giờ có khuấy, thêm vào dung dịch chiết 15 ml nước cất nóng và khuấy cho đến khi dung dịch đồng nhất. Lọc lấy dịch chiết, ly tâm lấy dịch trong. Thêm CaCl_2 vào dịch chiết với tỉ lệ 1g/1L, khuấy đều đến khi CaCl_2 được hòa tan hoàn toàn rồi để ở nhiệt độ 40°C qua đêm. Ly tâm lấy dịch trong, cô quay áp suất giảm đến khi thể tích còn khoảng bằng thể tích chất lỏng ion ban đầu, để nguội đến nhiệt độ phòng rồi thêm tiếp cồn 96° vào để kết tủa fucoidan với tỷ lệ thể tích là cồn:dịch là 3:1, khuấy đều rồi để lắng. Gạn lọc rồi ly tâm thu được fucoidan thô, rửa nhiều lần bằng cồn 96° . Fucoidan thu được màu nâu, được sấy tủa ở nhiệt độ 50°C đến khối lượng không đổi thu được fucoidan tự nhiên. So sánh tính hiệu suất ở mỗi tỷ lệ, kết quả được thể hiện ở Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Tỷ lệ bột rong nâu nguyên liệu:chất lỏng ion (NL-IL)

Tỷ lệ NL:IL (g/ml)	Hiệu suất chiết (% trọng lượng rong khô)
1:5	3,15
1: 10	3,44

1: 15	4,10
1:20	4,12

Khi tỷ lệ NL: IL là 1:20, hiệu suất chiết tách cao hơn, nhưng hiệu suất chiết tách tăng không đáng kể, do vậy tỷ lệ 1:15 đã được xác định là tỷ lệ tối ưu và được lựa chọn trong quy trình chiết tách theo sáng chế.

Chiết tách fucoidan bằng axit theo quy trình phổ biến hiện đang được sử dụng: Cân 10g mẫu rong khô sau khi loại màu và loại béo được cho vào cốc thủy tinh. Thêm 300 ml dung dịch acid HCl 1M và tiến hành chiết ở 85°C trong 3h. Lọc lấy dịch chiết, ly tâm lấy dịch trong, sau đó trung hòa bằng NaHCO₃ về pH7. Thêm CaCl₂ vào dịch chiết đã trung hòa với tỉ lệ 1g/1L, khuấy đều đến khi CaCl₂ được hòa tan hoàn toàn rồi để ở nhiệt độ 40°C qua đêm. Ly tâm lấy dịch trong, cô quay áp suất giảm đến khi thể tích còn khoảng 150ml, để nguội đến nhiệt độ phòng rồi thêm tiếp 600ml cồn 96° vào để kết tủa fucoidan (với tỷ lệ thể tích là cồn:dịch là 3:1) khuấy đều rồi để lắng. Gạn lọc rồi ly tâm thu được fucoidan, rửa nhiều lần bằng cồn 96°, fucoidan thu được màu nâu. Sấy tủa ở nhiệt độ 50-60°C đến khối lượng không đổi thu được fucoidan. Hiệu suất chiết tách fucoidan đạt 2,9 % trọng lượng rong khô.

Hiệu suất chiết tách fucoidan bằng axit theo quy trình phổ biến nhất đã công bố đạt 2,9 % trọng lượng rong khô, còn theo phương pháp của sáng chế này đã đạt hiệu suất là 4,1% tăng tới 1,2% (tăng 41,38%). Đây là hiệu suất chiết tách cao hơn hẳn so với phương pháp chiết thông thường. Nếu sản xuất ở quy mô công nghiệp thì sáng chế này mang lại lợi ích rất lớn.

Ví dụ 3: Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của fucoidan tự nhiên (Ftđ) và fucoidan trọng lượng phân tử thấp (M) thu được theo Ví dụ 1.

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư (TBUT) ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skehan và cộng sự (Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. (1990). Journal of the National Cancer Institute 82(13), pp.1107-1112). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamin B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm. Chất thử đã pha ở các nồng độ được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (190 μ L) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng axit trichloroacetic – TCA 20%. Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37 °C, rửa 3 lần bằng axit axetic rồi để khô ở nhiệt độ phòng. 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek). Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - (\text{OD}(\text{mẫu}) - \text{OD}(\text{ngày 0})) / (\text{OD}(\text{DMSO}) - \text{OD}(\text{ngày 0}))$$

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticin ở các nồng độ 10 μ g/mL; 2 μ g/mL; 0,4 μ g/mL; 0,08 μ g/mL được sử dụng như là chất đối chứng tham khảo; DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ

ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Bảng 2: Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của mẫu Ftd và mẫu M trên dòng tế bào ung thư đại tràng của người

Mẫu	Mw (g/mol)	IC ₅₀ (μ g/ml)
Ftd	465.000	73,52 $\pm$ 2,54
M	96.000	5,41 $\pm$ 0,36

Kết quả bảng 2 cho thấy: 2 mẫu Ftd và M đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng ung thư đại tràng ở người. Sáng chế này cho thấy mẫu M thể hiện hoạt tính tốt hơn 92,6 % so với mẫu Ftd. Yang và cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của trọng lượng phân tử của fucoidan từ *Undaria pinnatifida* đến hoạt tính chống ung thư, kết quả cho thấy khi giảm trọng lượng phân tử bằng cách thủy phân với axit thì hoạt tính chống ung thư tăng lên tới 75,9%.

Bảng 3: Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của mẫu M trên 3 dòng tế bào ung thư đại tràng HT29, ung thư tuyến giáp 8055 và ung thư cổ tử cung Hela

Nồng độ (μ g/ml)	Ức chế (%)					
	M			Ellipticin		
	HT29	8505	Hela	HT29	8505	Hela
100	100,48	98,65	90,62	98,32	99,45	101,25
20	88,83	81,49	80,34	84,85	85,14	78,62

4	43,26	38,17	47,36	53,10	51,33	5,17
0,8	8,51	12,11	5,21	25,67	27,61	22,14
IC ₅₀	5,41±0,36	6,07±0,62	6,50±0,59	0,33±0,03	0,32±0,03	0,41±0,04

Kết quả bảng 3 cho thấy: mẫu M thể hiện hoạt tính rất cao trên 3 dòng tế bào ung thư ở người bao gồm ung thư đại tràng, ung thư tuyến giáp và ung thư cổ tử cung. Hình ảnh tế bào ung thư sau khi đã xử lý với mẫu M được thể hiện trên Hình 4.

Ví dụ 4: Hoạt tính điều chỉnh rối loạn lipid máu của fucoidan tự nhiên Ftd và fucoidan trọng lượng phân tử thấp M

Sử dụng Poloxamer 407 (P-407) để tạo mô hình động vật bị tăng lipid máu ngoại sinh (Hor S Y, Farsi E, Yam M F et al. (2011), Journal of Medicinal Plants Research, 5(11), pp. 2261-2266). Nghiên cứu tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu được tiến hành theo phương pháp của Zobaer và cộng sự (Zobaer A, Sitesh C, Nazmul Q (2011), Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 11(4), pp. 263-270). Chuột được chia thành 5 lô (6 con/lô) như sau: Lô 1 (chứng sinh học): uống nước cất và tiêm nước muối sinh lý màng bụng; Lô 2 (chứng bệnh lý): uống nước cất và tiêm màng bụng dung dịch P-407; Lô 3 (chứng tham khảo): uống Atorvastatin (50 mg/kg) và tiêm màng bụng dung dịch P-407; Lô 4 (mẫu): uống Ftd liều 1000 mg/kg/ngày và tiêm màng bụng dung dịch P-407; Lô 5 (mẫu): uống M liều 1000 mg/kg/ngày và tiêm màng bụng dung dịch P-407. P-407 được tiêm liều đơn 600 mg/kg ở nồng độ 30% (w/v) trong nước lạnh, để qua đêm trong tủ lạnh. Sau 2 giờ tiêm dung dịch P-407 thì cho uống mẫu thử hoặc atorvastatin hoặc nước cất.

Sau 24 giờ kể từ khi được tiêm P-407, tất cả các chuột bị nhện đói qua đêm, lấy máu định lượng Cholesterol toàn phần, Triglyceride, LDL-Cholesterol và HDL-Cholesterol.

Các số liệu được xử lý trên Excel, được trình bày dạng $TB \pm SD$. Các thuật toán thống kê Student's t-test, F'test và phương pháp phân tích phương sai một nhân tố ngẫu nhiên (one way ANOVA) để kiểm tra sự sai khác có ý nghĩa so với đối chứng âm, với $P < 0,05$ được coi là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê.

Bảng 4. Sự thay đổi các chỉ tiêu sinh hoá máu

Mẫu	Cholesterol (mmol/L)	Triglyceride (mmol/L)	HDL- Cholesterol (mmol/L)	LDL- Cholesterol (mmol/L)
Đối chứng sinh lý	$2,74 \pm 0,21$	$1,65 \pm 0,06$	$1,32 \pm 0,07$	$0,97 \pm 0,03$
Đối chứng bệnh lý	$15,41 \pm 0,54$	$25,30 \pm 1,39$	$2,06 \pm 0,03$	$8,28 \pm 0,85$
Atorvastatin	$11,05^* \pm 1,77$	$14,03^* \pm 2,07$	$2,42^* \pm 0,20$	$5,82^* \pm 1,26$
Ftd	$14,54^* \pm 0,97$	$21,82^* \pm 1,44$	$2,22^* \pm 0,15$	$8,11^* \pm 0,37$
M	$13,48^* \pm 0,47$	$20,31^* \pm 2,04$	$2,73^* \pm 0,17$	$7,20^* \pm 0,48$

Ghi chú: * $P < 0,05$

Kết quả bảng 4 cho thấy: Hàm lượng Cholesterol sau khi cho uống Ftd và M đã giảm 5,62% và 12,52% (một cách tương ứng). Hàm lượng triglycerit sau khi cho uống Ftd và M đã giảm 13,81% và 19,76% (một cách tương ứng). Hàm lượng LDL-Cholesterol sau khi cho uống Ftd và M đã giảm 2,03% và 11,28% (một cách tương ứng). Hàm lượng HDL-Cholesterol (cholesterol tốt) sau khi cho uống Ftd và M đã tăng 8,03% và 32,84% (một cách tương ứng). Mẫu Ftd và M ở liều 1000 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm nồng độ Cholesterol, Triglycerid, LDL-

Cholesterol, làm tăng HDL-Cholesterol là loại cholesterol tốt trong máu của chuột bị tăng lipid máu. Trong đó, mẫu M theo sáng chế thể hiện hoạt tính tốt hơn.

Ví dụ 5: Hoạt tính điều hòa miễn dịch của fucoidan tự nhiên Ftđ và fucoidan trọng lượng phân tử thấp M

Hoạt tính điều hòa miễn dịch của các mẫu được đánh giá theo phương pháp của Manosroi và cộng sự (Manosroi A, Saraphanchotiwitthaya A, Manosroi J., (2005), Journal of Ethnopharmacology, 101, pp.90–94). Thử nghiệm xác định khả năng thực bào (Nitroblue tetrazolium (NBT) dye reduction assay) của đại thực bào có sử dụng dòng tế bào chuẩn RAW264. Cụ thể như sau: 20 µl hỗn dịch tế bào và 40 µl môi trường RPMI được đưa vào giếng nuôi trên đĩa 96 giếng. Tiếp theo, 20 µl mẫu nghiên cứu với các nồng độ khác nhau cũng được đưa vào giếng thử nghiệm. Dung dịch pha mẫu được sử dụng như đối chứng âm. Sau khi ủ 24h, thêm 20 µl hỗn dịch tế bào nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) đã bất hoạt nhiệt và 20 µl dung dịch NBT (Sigma) và ủ ở điều kiện nhiệt độ. Sau 60 phút, rửa giếng có tế bào macrophage bám đáy bằng môi trường RPMI và 4 lần với 200 µl methanol. Sau khi để khô ngoài không khí, thêm 120 µl 2 M KOH và 140 µl DMSO. Đọc kết quả bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 570 nm và phần trăm NBT bị khử được tính theo công thức:

$$\text{NBT reduction (\%)} = (\text{OD}_{\text{mẫu}} - \text{OD}_{\text{đối chứng}}) / (\text{OD}_{\text{đối chứng}}) \times 100.$$

Các số liệu được xử lý trên Excel, được trình bày dạng $\text{TB} \pm \text{SD}$. Các thuật toán thống kê Student's *t*-test, F'test và phương pháp phân tích phương sai một nhân tố ngẫu nhiên (one way ANOVA) để kiểm tra sự sai khác có ý nghĩa so với đối chứng âm, với $P < 0,05$ được coi là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê sinh học.

Bảng 5. Khả năng cảm ứng tăng cường thực bào của các mẫu nghiên cứu thông qua khả năng khử NBT

Tên mẫu	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Số lần thay đổi	Sai số
M	100	2,07*	0,27
	20	1,22	0,02
	4	1,17	0,07
	0,8	1,12	0,05
Ftd	100	1,51*	0,06
	20	1,49	0,13
	4	1,22	0,16
	0,8	1,15	0,03
Đối chứng dương LPS (Sigma)	20	1,79**	0,02
Đối chứng âm		1,00	0,01

Ghi chú: * $P < 0,05$

Kết quả ở bảng 5 cho thấy: Mẫu M và Ftd đều thể hiện khả năng tăng cường hoạt động khử NBT tăng 2,07 lần và 1,51 lần, một cách tương ứng so với đối chứng ở mức nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$, khả năng cảm ứng tăng cường hoạt động thực bào tốt (* $P < 0,05$). Khi nồng độ giảm dần thì mẫu cũng giảm mạnh hoạt tính này. Trong đó, mẫu M theo sáng chế thể hiện hoạt tính tốt hơn, thậm chí tốt hơn đối chứng dương LPS.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đưa ra quy trình và các điều kiện trong suốt quá trình chiết tách fucoidan hợp lý từ tất cả các loài rong nâu ở môi trường tự nhiên sử dụng chất lỏng ion cho hiệu suất cao hơn so với các phương pháp đang được sử dụng hiện nay. Nhờ đó từ nguồn tài nguyên rong nâu sẵn có tại Việt Nam, vật liệu fucoidan có trọng lượng phân tử thấp thu được nhiều hơn hẳn; Fucoidan trọng lượng phân tử thấp có nhiều tiềm năng ứng dụng trong phát triển các loại thực phẩm chức năng do fucoidan trọng lượng phân tử thấp đã thể hiện rõ một số hoạt tính sinh học có tiềm năng cao như gây độc tế bào trên 3 dòng ung thư ở người (tính chất để phát triển sản phẩm điều trị ung thư), hoạt tính miễn dịch và hoạt tính giảm lipid máu.

Đồng thời, sáng chế này cũng tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo hướng tới tạo ra các sản phẩm chứa fucoidan trọng lượng phân tử thấp có chất lượng và hiệu quả sử dụng cao hơn cho người tiêu dùng. Hơn thế nữa hiệu quả của sáng chế còn mang lại không chỉ ở khía cạnh kinh tế trong khai thác nguồn dược liệu biển quý giá, phong phú, sẵn có ở Việt Nam mà còn mang lại công ăn việc làm cho người lao động và tiết kiệm được nguồn tài nguyên thiên nhiên mà đa dạng sinh học biển đã mang lại cho con người.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết tách fucoidan trọng lượng phân tử thấp từ rong nâu sử dụng chất lỏng ion bao gồm các bước:

(i) xử lý tạo bột rong nâu nguyên liệu:

rong nâu sau khi thu thập về được rửa sạch rác, cát và mùn bằng nước rồi đem phơi khô trong bóng râm, sau đó nghiền mịn thành bột mịn, thu bột rong nâu;

chuẩn bị hỗn hợp dung môi hữu cơ theo tỷ lệ $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{Cl}:\text{H}_2\text{O}$ là 4:2:1 (v/v);

ngâm bột rong nâu trong hỗn hợp dung môi hữu cơ nêu trên theo tỷ lệ bột rong nâu:hỗn hợp dung môi hữu cơ là 1:20 (khối lượng/thể tích), khuấy đều, ngâm ở nhiệt độ phòng qua đêm;

lọc gạn thu bột rong nâu để hong khô, sau đó sấy đến khối lượng không đổi, thu bột rong nâu nguyên liệu;

(ii) chiết tách thu fucoidan tự nhiên:

ngâm qua đêm bột rong nâu nguyên liệu trong chất lỏng ion 1-butyl 3-methylimidazolium clorua ($[\text{Bmim}][\text{Cl}]$) theo tỷ lệ bột rong nâu nguyên liệu:chất lỏng ion là 1:15 (khối lượng:thể tích);

tiến hành chiết ở 85°C trong 3 giờ có khuấy, thêm vào dung dịch chiết nước cất nóng theo tỷ lệ nước cất nóng:chất lỏng ion là 1:10 (thể tích:thể tích) và khuấy cho đến khi dung dịch đồng nhất;

lọc lấy dịch chiết, ly tâm lấy dịch trong, thêm CaCl_2 vào dịch chiết với tỉ lệ 1g/1L, khuấy đều đến khi CaCl_2 được hòa tan hoàn toàn rồi để ở nhiệt độ 40°C qua đêm;

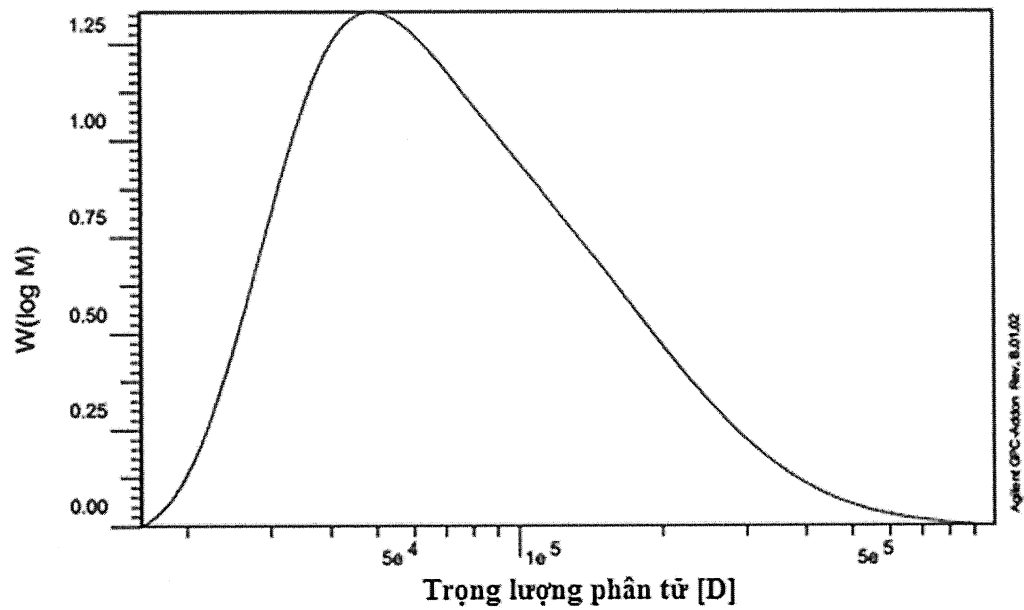
ly tâm lấy dịch trong, cô quay áp suất giảm đến khi thể tích còn khoảng bằng thể tích chất lỏng ion ban đầu, để nguội đến nhiệt độ phòng rồi thêm tiếp cồn 96° vào để kết tủa fucoidan với tỷ lệ thể tích là cồn:dịch là 3:1, khuấy đều rồi để lắng;

gạn lọc rồi ly tâm thu được fucoidan thô, rửa nhiều lần bằng cồn 96°, fucoidan thu được màu nâu, được sấy tủa ở nhiệt độ 50°C đến khối lượng không đổi thu được fucoidan tự nhiên; và

(iii) xử lý thu fucoidan trọng lượng phân tử thấp:

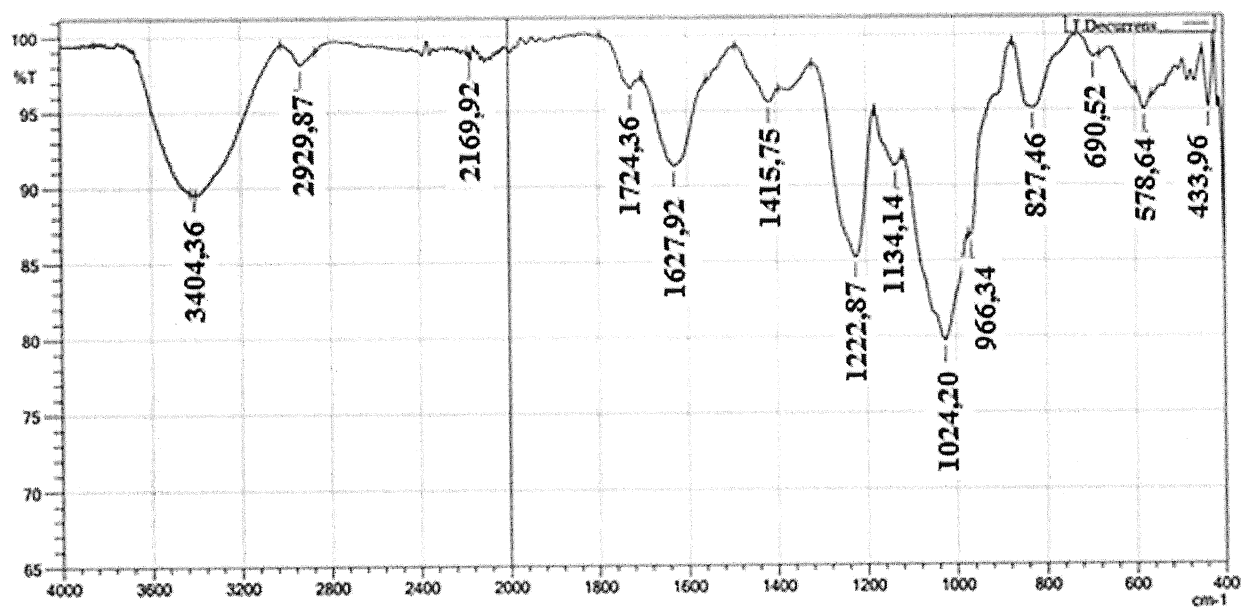
hòa tan fucoidan tự nhiên trong HCl 0,1N (tỷ lệ 20mg fucoidan/1mL dung dịch axit), sau đó đun nóng tại 85°C trong 30 phút, dung dịch được trung hòa bằng NaOH 0,1N, thẩm tách bằng màng 10kDa, đông khô để thu được mẫu fucoidan trọng lượng phân tử thấp.

2. Fucoidan trọng lượng phân tử thấp thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó fucoidan này có phổ sắc ký thẩm thấu gel GPC như được thể hiện trên Hình 1, phổ hồng ngoại IR như được thể hiện trên Hình 2 và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR như được thể hiện trên Hình 3.



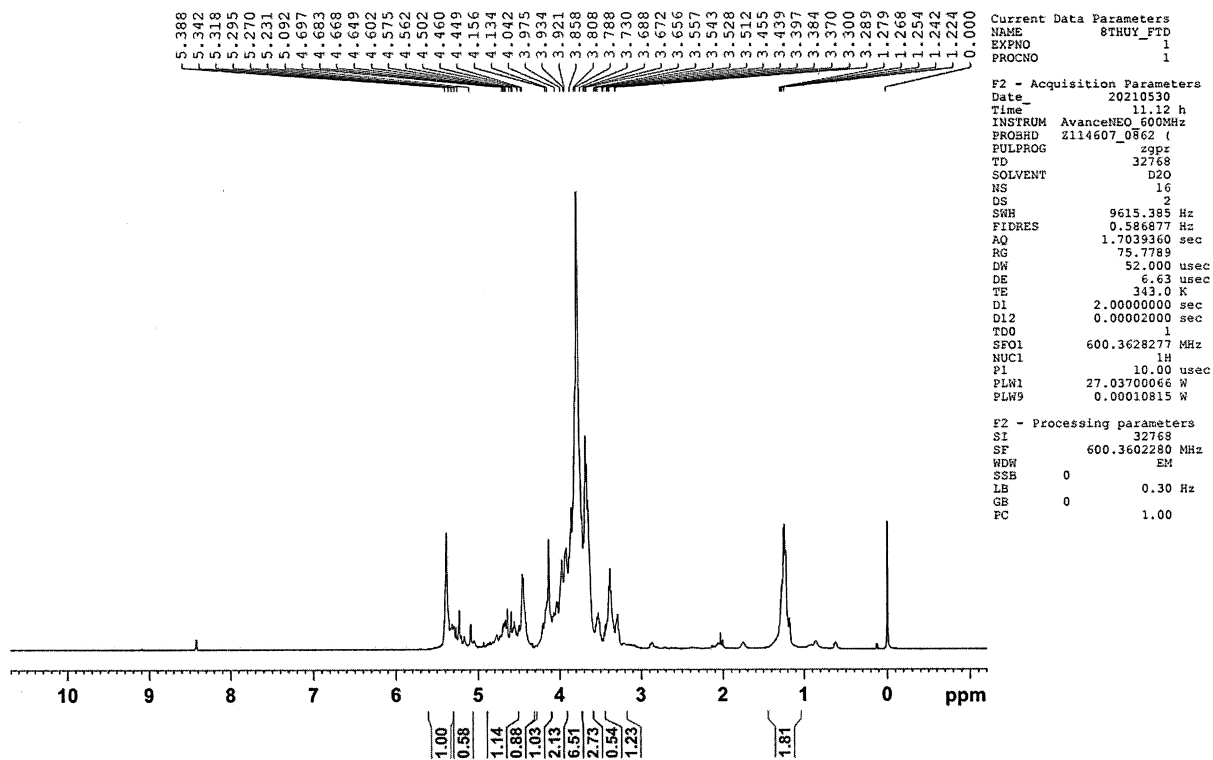
Mz:	1,7222e5	g/mol
My:	0,000000	g/mol
D :	1,6255e5	
[n] :	0,000000	ml/g
Vp :	9,6118e0	ml
Mp:	4,8751e4	g/mol
A :	1,2163e3	ml*V
10%	3,1491e4	g/mol
30%	4,6659e4	g/mol
50%	6,6546e4	g/mol
70%	1,0216e5	g/mol
90%	1,9516e5	g/mol

Hình 1

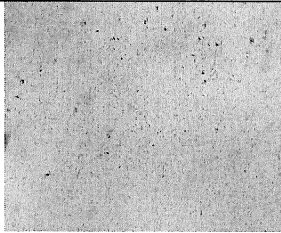
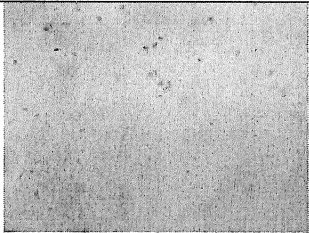
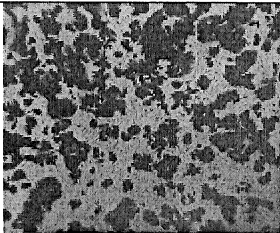
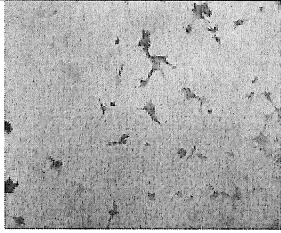
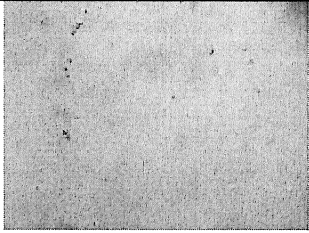
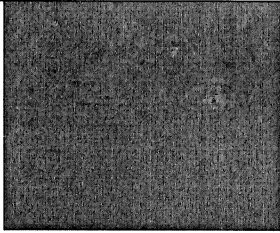
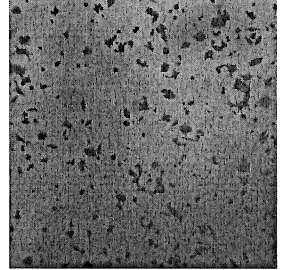
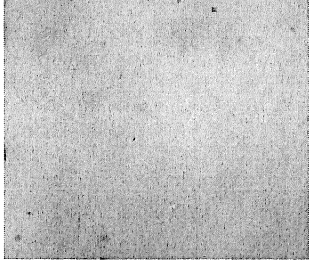
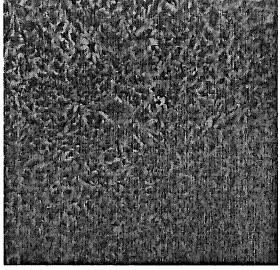


Hình 2

M-D2O-1H



Hình 3

Dòng tế bào	M	Ellipticin	Đối chứng
HT-29			
8505			
Hela			

Hình 4