

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN LIPIT, AXIT BÉO VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CÁC MẪU SINH VẬT BIỂN NGÀNH DA GAI (ECHINODERMATA) HẢI SÂM, SAO BIỂN, CẦU GAI

Phạm Quốc Long, Lê Mai Hương, Châu Văn Minh, Trịnh Thị Thu Hương,
Đỗ Hữu Nghị, Đoàn Lan Phương, Cẩm Thị Inh, Chu Quang Truyền,

Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Nguyễn Thị Vinh, Đoàn Việt Bình

Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

1. Mở đầu

Hải Sâm còn gọi là đĩa biển (*sea slug*), là loài động vật không xương sống thường gặp ở vịnh và những nơi có nhiều đá ngầm ở biển khơi. Hải sâm phân bố ở nhiều nước trên thế giới và có nhiều loài [9], ở nước ta có truyền thống từ lâu đời - ngư dân đánh bắt thường để chế biến món ăn đặc sản, hoặc phơi sấy khô làm thực phẩm và thuốc. Theo GS Đỗ Tất Lợi (2001), hải sâm bổ không kém gì nhân sâm nên gọi là sâm biển (*hải sâm*) và trong y học cổ truyền - hải sâm được xem như loại thuốc bổ thận, bổ âm, tráng dương ích tinh, nhuận táo, chữa lỵ, chữa viêm phế quản, thần kinh suy nhược, cầm máu, thành phần lipit của hải sâm còn có tác dụng chữa xơ vữa động mạch, hen suyễn...

Cầu gai (*Echinoidea*) thuộc họ cước bì (còn gọi là da gai- Echinodermata). Trứng cầu gai là một loại thực phẩm giàu dinh dưỡng có mùi vị thơm ngon đặc biệt. Ở một số nước châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc người ta có tập quán ăn trứng cầu gai như món bổ dưỡng cơ thể từ lâu đời [9,10]. Ngày nay một số nước ở châu Âu như Pháp, Ý rất coi trọng loại thực phẩm này. Vỏ cầu gai có tác dụng chữa mọi mệt, đau nhức, giải nhiệt, chống viêm [10]. Ở nước ta, Cầu Gai có nhiều loại và cũng đã được dân gian sử dụng như vị thuốc bổ dưỡng cơ thể từ lâu đời.

Sao biển (*Sea star*) cũng thuộc họ Da gai- Echinodermata đã được biết đến trên thế giới như một đối tượng tiềm năng chứa các chất có hoạt tính sinh học cao kháng u, chống viêm [10]...Sao biển cũng có nhiều loại và cũng đã được sử dụng như vị thuốc y học cổ truyền trong dân gian ở nước ta.

Những nghiên cứu hóa học về các đối tượng này còn rất sơ khai, mới chỉ có một số thông tin cơ bản nhất về thành phần sinh hóa như: hàm lượng protein, axit amin, glucit, các hoocmon steroid và thành phần các nguyên tố kim loại như: Ca; P; Fe; K...(Nguyễn Thị Vinh và Cs, 1999-2001). Đã đến lúc không thể chỉ nghĩ tới việc nghiên cứu gây nuôi, khai

thác nguồn tài nguyên sinh vật biển quý này phục vụ cho nội tiêu và xuất khẩu, mà còn phải tiến hành những nghiên cứu sâu về các chất có hoạt tính sinh học chứa trong đó; phân lập chứng minh cấu trúc, cũng như tìm hiểu bản chất của tác dụng sinh lí của chúng với cơ thể sống - qua đó nhằm tạo các sản phẩm cao cấp cho y, dược để phục vụ sức khỏe cộng đồng.

Nghiên cứu về thành phần lipit và các axit béo của 04 đối tượng tiêu biểu cho 3 loài: hải sâm, cầu gai và sao biển thuộc họ da gai: *Echidernmata*, cũng như các kết quả thử nghiệm sơ bộ *invitro* một số hoạt tính có chọn lọc của chúng được đề cập đến ở bài báo này cũng nhằm giải quyết một trong những vấn đề cần thiết phải tiến hành nghiên cứu sâu về các chất có hoạt tính sinh học mà chúng tôi đã nêu ở trên.

2. Nguyên liệu và phương pháp

Mẫu sinh vật biển:

Các mẫu sinh vật biển: Hải sâm đen (*Holothuria martensii* Semper); Cầu Gai (*Echinothrix calamaris* (Pallas)); Sao biển (*Asterina sp1.*); Trứng Cầu Gai Thanh Hoá (*Astropyga radiata*), được thu thập tại Quảng ninh, Thanh hóa từ tháng 03/2003-05/2003 sau khi xử lí mẫu và bảo quản theo đúng tiêu chuẩn quốc tế qui định cho mẫu sinh vật biển, mẫu được chuyển về Hà nội sử dụng để nghiên cứu hóa học và hoạt tính sinh học, các mẫu được các chuyên gia phân loại và lưu giữ tiêu bản [1].

Phân tích hàm lượng Lipit tổng (% so với trọng lượng mẫu tươi):

Tiến hành theo phương pháp: *Bligh E.G and Dyer W.J (1959)* đối với mẫu sinh vật biển [2].

Phân tích thành phần các axit béo

Tiến hành theo phương pháp phân tích tiêu chuẩn quốc tế: *Tiêu chuẩn ISO/FDIS 5590:1998*, LB Đức [3]. Các mẫu phân tích dạng metyl este axit béo trên máy GC-MSD: Máy sắc ký khí HP-6890, ghép nối với Mass Selective Detector Agilent 5973; Cột mao quản: HP-5MS -0.25(m * 30m *0.25mm); Khí mang: He; Chương trình nhiệt độ: 80(1 min.) - 40/ min. -150 (1min.) -10/min - 260 (10min.); có sử dụng thư viện phổ khối: WILEY275.L và NIST 98.L

Đánh giá hoạt tính sinh học các dịch chiết:

Các mẫu sinh vật biển được xử lý, tạo dịch chiết thử nghiệm hoạt tính sinh học theo một qui trình chung theo tiêu chuẩn quốc tế qui định [5].

◆ *Thử hoạt tính kháng VSV kiểm định (Antimicrobial activity assay)*

Thử hoạt tính kháng vi sinh vật bằng các phương pháp khoan giấy lọc đặt trên bề mặt thạch theo được điển Việt Nam III [6] và trên phiến vi lượng 96 giếng của các mẫu chiết theo phương pháp hiện đại của Vanden Bergher và Vlietlinck (1994) [7]. Kháng sinh kiểm định bao gồm: Ampixilin đối với vi khuẩn Gr(+), Tetracylin đối với vi khuẩn Gr(-), Nystatin, Amphotericin B đối với nấm sợi và nấm men cho.

Chủng vi sinh vật kiểm định bao gồm :

- Vi khuẩn Gr (-): *Escherichia coli* (ATCC 25922)
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 25923)
- Vi khuẩn Gr(+): *Bacillus subtilis* (ATCC 27212)
Staphylococcus aureus.(ATCC12222)
- Nấm mốc: *Aspergillus niger*439
Fusarium oxysporum LM42
- Nấm men: *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC7754)
Candida albicans SH20
- Đọc kết quả: Mẫu thô có MIC 200µg/ml ; mẫu tinh có MIC 50µg/ml là có hoạt tính.

◆ *Thử nghiệm hoạt tính chống oxy hoá trong hệ DPPH (Antioxydant)*

Phản ứng dựa trên nguyên lý như sau: DPPH (1,1- Diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma) có khả năng tạo ra các gốc tự do bền trong dung dịch EtOH bão hoà. Hoạt tính chống ôxy hoá được đánh giá thông qua giá trị hấp phụ ánh sáng của dịch thí nghiệm so với đối chứng khi đọc trên máy Elisa ở bước sóng 515nm. Thí nghiệm được tiến hành theo các phương pháp của các tác giả Davies & ctv (1998) [8]; Shela Goinstein & ctvn (2003) [9].

Giá trị trung bình của SC% (*Scavenging capacity*) được đưa vào chương trình xử lý số liệu Excel window tìm ra % trung bình ± độ lệch tiêu chuẩn của phép thử được lặp lại 3 lần, lấy giá trị TB. Các mẫu có giá trị: SC ≥30%, được coi là có biểu hiện dương tính để tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo.

◆ *Thử nghiệm gây độc tế bào invitro (Cytotoxicity activity assay)*

Theo phương pháp của Likhiwitayawuid K. et al. đang được tiến hành tại viện nghiên cứu ung thư Quốc gia của Mỹ (NCI) [4]

Dòng tế bào:

- Dòng KB (*Human epidemoid carcinoma-ung thư biểu mô*) từ phòng thí nghiệm Bioassay trường Đại học Dược Illinois- USA
- Dòng F1 (Fibril sarcoma of Uteus-ung thư màng tử cung)

- Dòng RD (ung thư màng tim-Rhabdosarcoma) từ Viện VSDT TU

Độc kết quả:

Mẫu thô cho giá trị $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$; mẫu tinh cho giá trị $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$, sẽ được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hàm lượng Lipit tổng số

Hàm lượng Lipit tổng số (% so với mẫu tươi) của 04 mẫu sinh vật biển đã được xác định, tên khoa học, thời gian và địa điểm thu mẫu được ghi trên bảng 1

Bảng 1: Hàm lượng Lipit tổng số

STT	Tên Việt Nam	Kí hiệu mẫu phân tích	Thời gian & địa điểm thu mẫu	Hàm lượng Lipit tổng số [% so với mẫu tươi]
1	Hải Sâm đen (<i>Holothuria martensii</i> Semper)	HSI03.03	03/03 Quảng Ninh	0.58
2	Cầu Gai (<i>Astropyga radiata</i>)	CGI 03.03	03/03 Quảng Ninh	0.63
3	Sao Biển (<i>Asterina sp1.</i>)	SBI 03.03	03/03 Quảng Ninh	0.68
4	Trứng Cầu Gai (<i>Astropyga radiata</i>)	TCGI 05.03	05/03 Thanh hóa	9.97

Hàm lượng Lipit tổng số của Hải sâm (0,58%); Cầu gai (0,63%); Sao biển (0.68%) là ở mức trung bình và cũng phù hợp với các số liệu đã phân tích ở các tài liệu quốc tế (Svetashev,1996; Ackman 1997) và trong nước (Lâm Ngọc Trâm, 1999). Riêng hàm lượng Lipit tổng số của trứng Cầu gai là rất cao (9,97%), điều này chỉ ra giá trị dinh dưỡng đặc biệt của đối tượng này.

3.2. Thành phần các axit béo

Thành phần và hàm lượng các axit béo tồn tại trong lipit mỗi loại đối tượng nguyên liệu tự nhiên, sẽ quyết định đến bản chất và giá trị thực tiễn của loại nguyên liệu đó. Trong đối tượng sinh vật biển, ngoài sự có mặt các axit béo thông dụng thường có trong các nguyên liệu tự nhiên trên cạn như: Myristic C14:0, Palmitic C16:0, Stearic C18:0, Oleic C18:1, Linoleic C18:2 và Arachidonic C20:4 (AA); còn có sự tham gia của các axit béo không no mạch dài với hoạt tính sinh học cao, đặc thù riêng chỉ có trong sinh vật biển là Eicosapentaenoic C20:5 (EPA) và Docosaheptaenoic C22:6 (DHA).

Kết quả phân tích thành phần và hàm lượng các axit béo (% so với tổng axit béo) của 04 mẫu sinh vật biển được chỉ ra trên bảng 2.

Bảng 2: Thành phần các axit béo của 04 mẫu sinh vật biển

TT	Axit béo	Hải sâm đen [%]	Sao biển [%]	Cầu gai [%]	Trứng cầu gai [%]
1	C14:0	2.97	2.12	19.42	8.67
2	C15:0	2.37	3.21	-	1.80
3	C16:1(n-7)	11.30	3.31	7.02	6.64
4	C16:0	10.15	9.10	15.97	18.82
5	C17:0	1.45	0.83	-	1.11
6	C18:3	1.32	-	-	-
7	C18:2(n-6)	0.67	-	-	1.73
8	C18:1(n-9)	5.39	9.14	8.59	10.54
9	C18:0	5.67	7.50	2.35	4.76
10	C19:0	0.54	3.28	-	0.45
11	C20:4 (n-6) (AA)	8.99	9.31	6.72	8.18
12	C20:5(n-3) (EPA)	8.55	5.47	6.79	7.83
13	C20:2	-	5.82	9.13	4.76
14	C20:1(n-9)	8.55	10.12	11.94	12.25
15	C20:0	2.02	1.08	-	-
16	C21:0	0.82	1.02	-	-
17	C22:6(n-3) (DHA)	1.13	-	-	2.51
18	Others	28.11	28.69	12.07	9.95
19	Tổng các axit béo no	25.99	28.14	37.74	35.61
20	Tổng các axit béo không no	45.90	43.17	50.19	54.44

Thành phần và hàm lượng các axit béo trong các loài nói chung đều có chứa các loại axit béo phổ dụng trong thành phần sinh vật biển, cả 3 loài đều có hàm lượng các axit béo không no, đa nối đôi tương đối cao (41,2-50,19%), và cả 3 loài đều có mặt axit béo rất quan trọng trong cơ thể sống là AA với hàm lượng (6,72-9,31%). Tuy nhiên có một số khác biệt như sau:

- Hải sâm đen: trong hàm lượng các axit béo không no (41,2%) có chứa 2 thành phần axit béo có hoạt tính sinh học cao là EPA (8,55%) và DHA (1,59%).

- Sao biển: trong hàm lượng các axit béo không no của nó (43,17%), nhưng chỉ có mặt EPA với hàm lượng (5,47%).

- Cầu gai và trứng Cầu gai có hàm lượng các axit béo không no tương đối cao từ (49,68-50,19%), tuy nhiên trong khi ở mẫu Cầu gai chỉ có mặt EPA (6,79%), thì trong mẫu trứng Cầu gai lại có mặt cả 2 loại EPA (7,83%) và DHA (2,51%).

3.3. Một số kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học

Các kết quả thử hoạt tính kháng VSV kiểm định (*Antimicrobial activity assay*) được chỉ ra trên bảng 3; Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hoá trong hệ DPPH (*Antioxydant*)

trên bảng 4; và kết quả thử nghiệm gây độc tế bào (*Cytotoxicity activity assay*) được chỉ ra trên bảng 5.

Bảng 3: Kết quả thử kháng VSV kiểm định

STT	Ký hiệu mẫu (MeOH)	Nồng độ ức chế tối thiểu MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		Vi khuẩn Gr(-)		Vi khuẩn Gr(+)		Nấm mốc		Nấm men	
		<i>E.Coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtillis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>ASP.niger</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>C.albicans</i>	<i>S.cerevisiae</i>
1	HSI 03.03	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	SBI 03.03	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	CGI 03.03	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	TCGI 05.03	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Bảng 4: Kết quả thử hoạt tính chống Oxy hóa

STT	Ký hiệu mẫu (MeOH)	Giá trị SC (%)	Ghi chú
1	DMSO	0,00±0,00	Âm tính
2	Chứng (+)	78,33±0,49	Dương tính
3	HSI 03.03	9,9±0,7	Âm tính
4	CGI 03.03	26,3±0,5	Âm tính
5	SBI 03.03	19,9±0,1	Âm tính
6	TCGI 05.03	38,7±0,0	Có hoạt tính

Bảng 5: Kết quả thử nghiệm gây độc tế bào

STT	Ký hiệu mẫu	Dòng tế bào Giá trị IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)			Kết luận
		KB	FL	RD	
1	Chứng (+)	0,002	0,004	0,001	
3	HSI 03.03	>20	>20	>20	Âm tính
4	CGI 03.03	>20	19,2	>20	Dương tính 1 dòng
5	SBI 03.03	>20	>20	>20	Âm tính
6	TCGI 05.03	>20	>20	>20	Âm tính

KB: Tế bào ung thư biểu mô người

RD: Tế bào ung thư màng tim người

FL: Tế bào ung thư màng tử cung người

Kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học cho thấy:

- Cả 4 mẫu đều không có hoạt tính kháng VSV kiểm định.

- Hoạt tính chống oxy hóa: trong 04 mẫu thử, chỉ có mẫu trứng câu gai (TCGI) là có hoạt tính với giá trị SC = 38,7%, đây là 1 dấu hiệu tích cực để ta tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo.

- Đặc biệt là mẫu cầu gai (CGI) là có tín hiệu dương tính đối với 01 dòng tế bào ung thư màng tử cung người (FL) với giá trị $IC_{50}(\mu\text{g/ml}) = 19,2$. Đây cũng là dấu hiệu rất quan trọng giúp cho ta định hướng tập chung nghiên cứu sâu thêm về hóa học và hoạt tính sinh học theo hướng này của mẫu cầu gai.

Từ các kết quả nghiên cứu về hóa học và hoạt tính sinh học ở trên cho thấy có thể có mối liên quan giữa hoạt tính sinh học và sự có mặt (với thành phần và hàm lượng cao) của các axit béo có hoạt tính sinh học như: AA, EPA, DHA trong mẫu cầu gai và trứng của nó. Điều đó cũng chỉ định cho ta nên chú ý tập chung nghiên cứu sâu hơn về hóa học và hoạt tính sinh học của đối tượng mẫu cầu gai và trứng cầu gai trong vùng biển Việt nam.

4. Kết luận

1) Đã xác định hàm lượng lipit tổng số của 04 mẫu: hải sâm (0,58%); cầu gai (0,63%); sao biển (0,68%). Riêng hàm lượng lipit tổng số của trứng cầu gai là rất cao (9,97%), điều này chỉ ra giá trị dinh dưỡng của loại nguyên liệu đặc biệt này.

2) Thành phần và hàm lượng các axit béo trong các loài nói chung đều có chứa các loại axit béo phổ dụng trong thành phần sinh vật biển, cả 3 loài đều có mặt axit béo rất quan trọng trong cơ thể sống là AA với hàm lượng (6,72-9,31%). Các axit béo có hoạt tính sinh học cao là EPA và DHA, có trong hải sâm đen là: EPA (8,55%) và DHA (1,59%); sao biển là: EPA (5,47%); cầu gai là: EPA (6,79%), và trứng cầu gai là: EPA(7,83%) và DHA(2,51%).

3) Kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học cho thấy: trong cả 4 mẫu đều không có hoạt tính kháng VSV kiểm định. Hoạt tính chống Oxy hóa, chỉ có mẫu trứng cầu gai có hoạt tính với giá trị $SC = 38,7\%$; và đặc biệt mẫu Cầu gai (CGI) là có tín hiệu dương tính đối với 1 dòng tế bào ung thư màng tử cung người (FL) với giá trị $IC_{50}(\mu\text{g/ml}) = 19,2$. Điều đó chỉ định cho ta nên chú ý tập trung nghiên cứu sâu hơn về hóa học và hoạt tính sinh học của đối tượng mẫu cầu gai và trứng cầu gai trong vùng biển Việt nam.

Lời cảm ơn:

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của chương trình hợp tác Italia-Việt nam 2003-2005.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Richard J.P Cannell, *Natural Products Isolation*, Humana Press-Totowa, New Jersey (1998), pp 303-327.
2. Bligh E.G and Dyer W.J, Adaptation of a Macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, Vol. 37(1959), pp 911-917.
3. ISO/FDIS 5590: 1988, Germany.

4. Likhitwitayawuid K, Cytotoxic and antimalarial bisbenzyliso-quinon alkaloids from *Stephania erecta*, *J. Natural Product*, 56(1993), pp 30-36.
5. Shmitz F.J, Bowden BF, Toth SI, *Marine Biotechnology*, Plenum Press, Vol.1, New York (1993), pp 197-308.
6. Bộ Y tế, *Dược điển Việt Nam III*, NXB Y học, Hà nội, T.3, phụ lục 10(1994),378tr.
7. Vanden, B., and Vlietinck, A. J., Antimicrobial screening of natural products, *Method in Plant Biochemistry* ,4(1991), pp 47- 68.
8. Davies, K. J. A., and Goldberg, A. L., 1,1-Diphenyl-2-pyerylhydrazyl radical (DPPH) scavenging, *J. Biol. Chem* , 17 (1987), pp 262-271.
9. Shela G., Olga, M. B., Elena, K., Antonin, L., Milan, C., Nuria, G. M., Ratiporn, H., Yong-Seo, P., Soon- Teck, J., Simon, T., Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some spanish olive oils as determined by four different radical scavenging test, *J. Biol. Chem*, 14(2003), pp 154- 159.
10. M. Suffness and J. M. Pezzuto, In vitro screening of potential cancer chemopreventive agents, *Methods in plant Biochemistry*, 6(1991), pp 47-69.

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, Nat., Sci., & Tech., T.XX, N₀4, 2004

STUDY ON LIPID, FATTY ACID COMPOSITION AND BIOACTIVE OF ECHINODERMATA OF MARINE VIETNAM

**Pham Quoc Long, Le Mai Huong, Chau Van Minh, Trinh Thi Thu Huong,
Đo Huu Nghi, Đoàn Lan Phuong, Cam Thi Inh, Chu Quang Truyen**

*Institute of Natutral Products Chemistry
Vietnamese Academy of Science and Technology*

Nguyen Thi Vinh, Đoàn Viet Binh

Institute of Biotechnology, Vietnamese Academy of Science and Technology

The content of lipid and fatty acids composition of four samples of Echinodermata of Marine Vietnam: sea slug (*Holothuria martensii* Semper); sea urchin and egg (*Echinothrix calamaris* (Pallas)); sea star (*Asterina sp.*) were determined.

Their bioactive such as antimicrobial activity; antioxidant and cytotoxicity activity were tested invitro and discussed also.

Key words:

MIC - Minimum Inhibitory Concentration

SC - Scavenging Capacity (%)

IC₅₀ - Inhibitory Concentration of 50% cell growth