

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN VÀ HÀM LƯỢNG CÁC LỚP CHẤT LIPID, PHOSPHOLIPID, AXIT BÉO, VÀ PHOSPHATIDYLCHOLINE LOÀI SAN HÔ MỀM *CAPNELLA* SP.

Đặng Thị Phương Ly^{1*}, Trần Quang Đệ³, Phạm Minh Quân¹, Đinh Thị Kim Hoa⁵, Nguyễn Thị Thêu¹, Lưu Thị Hải Linh⁴, Phạm Quốc Long¹, Andrey Imbs Borisovich²

¹Viện Hóa học Các hợp chất Thiên nhiên-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Sinh vật biển Zhirmunsky, phân viện Viễn Đông, Vladivostok, LB Nga

³Đại học Cần Thơ

⁴Đại học Sư phạm Hà Nội 2

⁵Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

*E-mail: phuongly1412@gmail.com

Ngày nhận bài: 29-6-2016

TÓM TẮT: Hàm lượng lipid tổng của mẫu san hô mềm *Capnella* sp. chiếm $1,44 \pm 0,10\%$ so với trọng lượng mẫu tươi. Trong thành phần axit béo có mặt các axit béo tetracosapolyenoic 24:5n-6 và 24:6n-3 là axit béo đánh dấu điển hình cho san hô mềm (san hô tám ngón) và các axit béo đánh dấu cho vi sinh vật cộng sinh như 18:5n-3, 18:2n-6, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:4n-3. Kết quả phân tích lớp chất lipid cho thấy trong lipid tổng có mặt các lớp chất lipid chính là lipid phân cực, sterol, axit béo tự do, triacylglycerol, monoalkyldiacylglycerol, hydrocacbon và sáp, trong đó lipid phân cực chiếm hàm lượng cao nhất ($21,14 \pm 1,17\%$ hàm lượng lipid tổng). Thành phần phospholipid của san hô mềm *Capnella* sp. có mặt các phân lớp phospholipid đặc trưng của động vật ngành Cnidarian là phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphonolipid là ceramide aminoethylphosphonate, trong đó phosphatidylcholine chiếm hàm lượng cao nhất ($35,53 \pm 1,46\%$ tổng phospholipid). Đây là lần đầu tiên ở Việt Nam, thành phần và hàm lượng các dạng phân tử trong lớp chất phosphatidylcholine từ loài san hô mềm của Việt Nam được nghiên cứu và công bố, kết quả đã xác định được sự có mặt của 13 dạng phân tử bằng phương pháp phổ khối hiện đại LC-MS IT TOF với độ chính xác cao. Hai dạng phân tử chiếm hàm lượng cao nhất là PC 18:0e/20:4 và PC 16:0e/20:4.

Từ khóa: Lipid tổng (TL), lipid phân cực (PoL), lipid không phân cực (NL), axit béo tự do (FFA), sterol (ST), triacylglycerol (TAG), monoalkyl diacylglycerol (MADAG), hydrocacbon + sáp (WE), phosphatidylcholine (PC).

MỞ ĐẦU

Rạn san hô là tài sản biển vô cùng quý giá của các quốc gia có biển nói chung và Việt Nam nói riêng, chúng góp phần duy trì cân bằng sinh thái biển và tạo cơ hội để phát triển nhanh một số lĩnh vực trong nền kinh tế của đất nước. Trong đó, lipid là một thành phần hóa học quan trọng, chiếm tới 40% sinh khối khô

của san hô, và là cơ sở cấu trúc của màng tế bào các polip, có chức năng dự trữ năng lượng cho san hô trong thời gian dài.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu trước đây về lipid từ san hô mới chỉ dừng ở mức độ nghiên cứu đa dạng sinh thái, đánh giá hiện trạng rạn san hô, các nghiên cứu hóa sinh bước đầu thu được những số liệu về hàm lượng lipid tổng,

thành phần axit béo, thành phần các lớp chất, một số nghiên cứu có đi sâu vào nghiên cứu thành phần các lớp chất lipid không phân cực [1]. Cho tới nay chưa có nhiều thông tin về thành phần dạng phân tử của lớp chất phospholipid - lớp chất chứa đựng nhiều thông tin về quá trình sinh tổng hợp lipid của san hô, ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Trong nghiên cứu này, ngoài các phân tích về thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid, phospholipid, axit béo, nhóm tác giả đi sâu vào nghiên cứu các dạng phân tử trong lớp chất phosphatidylcholine (PC) của mẫu san hô mềm *Capnella* sp. thu thập tại vùng biển Việt Nam. Đây cũng là kết quả công bố đầu tiên tại Việt Nam về dạng phân tử của lớp chất phospholipid từ san hô.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Mẫu san hô mềm *Capnella* sp. (Anthozoa, Octocorallia, Alcyonacea, Nephtheidae) được thu thập tại vịnh Nha Trang và vùng biển lân cận. Mẫu được định tên bởi PGS. TS. Đỗ Công Thung và các cộng sự tại Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chiết lipid tổng

Lipid tổng (TL) được chiết theo phương pháp của Folch, J. F., [2].

Phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid

Lipid tổng được chấm lên bản mỏng silica gel (6 × 6 cm) 3 vệt với nồng độ lần lượt là 5, 10, 15 μ l, sau đó được khai triển trong hệ dung môi n-Hexan: Et₂O:CH₃COOH (70:30:2, v/v/v), hiện hình bằng 10% H₂SO₄ trong MeOH. Bản mỏng sau đó được đem sấy ở nhiệt độ 180°C trong thời gian 10 phút trước khi scan trên máy Epson Perfection 2400 PHOTO (Nagano, Nhật Bản) với độ phân giải và kích thước tiêu chuẩn. Phần trăm của các lớp chất trong lipid tổng được xác định dựa trên sự đo diện tích và cường độ màu trong chương trình phân tích hình ảnh Sorbfil TLC Videodensitometer DV (Krasnodar, LB Nga) [3, 4].

Nghiên cứu thành phần và hàm lượng các lớp ...

Phương pháp phân tích thành phần và hàm lượng các lớp chất phospholipid

Phân tích định tính sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng 2 chiều

Mẫu lipid tổng (5 μ L) được hòa tan trong một lượng nhỏ CHCl₃, chấm lên bản mỏng silica gel SiO₂ (6 × 6 cm) và triển khai với hệ thứ nhất A: CHCl₃:MeOH:28%NH₄OH (70:30:5, v:v:v), chạy xong sấy khô, rồi tiếp tục chạy trong hệ dung môi B: CHCl₃:MeOH:(CH₃)₂CO:CH₃COOH:H₂O (70:30:5:5:2). Sấy khô rồi sử dụng thuốc thử ninhydrin 0,2% trong BuOH xác định các lớp chất PS, PE, CAEP, và LPE, các lớp chất PC, PI, LPC, LPI được xác định bằng thuốc thử molybdate [5].

Phân tích định lượng

Thành phần hàm lượng của các phospholipid được xác định theo phương pháp Kostetsky [6].

TL (5 μ L) được chấm lên bản mỏng silica gel SiO₂ (6 × 6 cm), sau đó khai triển trong hệ dung môi 1 và 2 như trên. Hiện màu bằng dung dịch 10% H₂SO₄ trong MeOH rồi hơ nóng trên bếp sấy. Xác định vị trí các lớp chất rồi cạo ra cho vào các ống nghiệm đã đánh dấu tương ứng, thêm 50 μ L HClO₄ rồi đun trên bếp ở nhiệt độ 180 - 190°C trong thời gian 20 phút. Lấy các ống nghiệm ra để nguội, thêm tiếp vào mỗi ống nghiệm 450 μ L amonium molybdate, lắc kỹ, đun cách thủy ở nhiệt độ sôi của nước trong 15 phút. Lấy ra, để nguội rồi tiến hành đo trên máy quang phổ kế UV 1800 (Shimadzu, Nhật Bản). Tiến hành đo 3 lần và lấy giá trị trung bình hàm lượng các lớp chất, tính hàm lượng phần trăm.

Phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các axit béo

Axit béo được methyl hóa sang dạng methyl ester bằng tác nhân H₂SO₄/MeOH 2%, nhiệt độ cho quá trình chuyển hóa là 80°C, trong thời gian 2 h. Sau đó, hỗn hợp được phân tích trên máy GC-MS của hãng Shimadzu QP-2010 với cột sắc kí LBX (30 m × 0,25 μ m × 0,25 μ m), sử dụng thư viện phổ chuẩn NIST để so sánh.

Phương pháp phân lập, xác định dạng phân tử lớp chất PC

Sau khi phân tích định tính, định lượng các phân lớp phospholipid của mẫu san hô mềm,

phân lớp phosphatidylcholine được phân lập bằng sắc kí cột (CC) với hệ dung môi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3 = 90/10/5$ (v/v/v), sau đó tinh chế lại bằng sắc kí bản mỏng với hệ dung môi $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 : 1\text{-propanol} : \text{CHCl}_3 : \text{MeOH}$ (25 : 35 : 10 : 10 theo thể tích).

Phân đoạn thu được được hòa tan trong MeOH và phân tích trên thiết bị LCMS IT-TOF của hãng Shimadzu để nhận biết các dạng phân tử của lớp chất PC. Các phân tích HPLC-HRMS được thực hiện với hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu Prominence với 2 bơm áp suất cao, lò CTO-20A, bơm mẫu tự động, thiết bị truyền dẫn CBM-20A, thiết bị khử khí DGU-20A3, cột Shim-Pack diol (50 mm \times 4,6 mm ID, 5 μm) (Zhimadzu, Kyoto, Japan), sử dụng hai hỗn hợp dung môi A hexane:2-propanol: $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{N}(\text{CH}_3)_3$ 82:17:1:0,08 (theo thể tích) và hỗn hợp dung môi B (propanol-2): $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{N}(\text{CH}_3)_3$ 85:14:1:0,08 (theo thể tích). Lipid được phát hiện bởi bộ phận phân tích khối kết hợp song song hai kỹ thuật IT và TOF trong một bộ phận của thiết bị Shimadzu LCMS-IT-TOF (Kyoto, Japan), hoạt động đồng thời ở cả hai chế độ ion âm và ion dương trong mỗi phân tích trong điều kiện ion hóa ESI và APCI. Các dạng phân tử của từng phân lớp phospholipid được phát hiện bởi HRMS và xác định bằng việc so sánh với bộ phổ chất chuẩn của hãng Shimadzu Solution với phần mềm xử lý v.3.60.361. Quá trình định lượng các loại phân tử của mỗi lớp chất lipid phân cực được tính toán theo diện tích mỗi pic chất thu được trên phổ ion âm và ion dương [7].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thành phần và hàm lượng axit béo

Hàm lượng lipid tổng (bảng 1) của mẫu san hô mềm *Capnella* sp. chiếm $1,44 \pm 0,10\%$ trọng lượng tươi và chiếm tới $8,15 \pm 0,90\%$ trọng lượng mẫu khô. Trước đó, 12 loài san hô mềm được Imbs, A. B., và các cộng sự Việt Nam nghiên cứu có hàm lượng lipid tổng dao động trong khoảng từ 2,8% đến 22,9% trọng lượng mẫu khô [8]. Theo nghiên cứu của tác giả Lưu Văn Huyền [9] về san hô Việt Nam, hàm lượng này ở 46 loài san hô mềm Việt Nam dao động từ 0,46% đến 2,2% trọng lượng mẫu tươi. Như vậy, các số liệu thu được trong

nghiên cứu này khá thống nhất với các kết quả nghiên cứu trước đó về hàm lượng lipid tổng của các loài san hô mềm Việt Nam khác.

Bảng 1. Hàm lượng lipid tổng của mẫu san hô mềm nghiên cứu (n=3)

Tên loài	Hàm lượng lipid tổng	
	% trọng lượng mẫu tươi	% trọng lượng mẫu khô
<i>Capnella</i> sp.	$1,44 \pm 0,10$	$8,15 \pm 0,90$

Ghi chú: n: độ lặp lại của mỗi thí nghiệm.

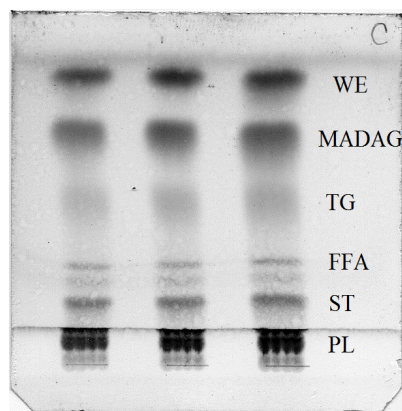
Thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid trong lipid tổng

So với các tài liệu nghiên cứu trước đây [1], thành phần và hàm lượng các lớp chất trong lipid tổng của loài san hô được nghiên cứu về cơ bản đều bao gồm hầu hết các lớp chất chính đã biết là lipid phân cực (PoL), sterol (ST), axit béo tự do (FFA), triacylglycerol (TAG), monoanlyl diacylglycerol (MADAG), hydrocacbon + sáp (WE). Kết quả nghiên cứu cho thấy các lớp chất lipid phân cực PoL (24,91%) và monoalkyl diacylglycerol MADAG (26,15%) chiếm hàm lượng cao nhất trong lipid tổng. Trong số các lớp chất lipid của san hô, đây cũng là 2 lớp chất được các nhà nghiên cứu quan tâm nhất vì sự đa dạng trong thành phần hóa học và các hoạt tính sinh học thú vị đặc biệt là lớp chất PoL. Hàm lượng lớp chất lipid phân cực trong lipid tổng các loài san hô mềm Việt Nam theo nghiên cứu của tác giả Lưu Văn Huyền (2010) dao động trong khoảng từ 13,6% đến 58,8% hàm lượng lipid tổng [9]. Ở các loài san hô mềm thu thập tại vùng biển Okinawa, Nhật Bản [10], hay các loài san hô mềm thu thập tại vùng nước sâu Newfoundland và Labrador, Đại Tây Dương [11], lớp chất lipid phân cực đều chiếm hàm lượng cao, có thể lên tới 40% hàm lượng lipid tổng. Lớp chất hydrocacbon và sáp (HW) trong mẫu san hô mềm nghiên cứu chiếm hàm lượng khá lớn, chỉ sau hàm lượng hai lớp chất lipid phân cực (PoL) và monoalkyldiacylglycerol (MADAG), chúng chiếm khoảng 19% hàm lượng lipid tổng. Hai lớp chất sterol (ST) và triacylglycerol (TAG) có tỉ lệ khá đồng đều, chiếm lần lượt là 11,32% và 12,31%. Hàm lượng lớp chất axit béo tự do trong lipid tổng của ba mẫu san hô

chỉ dao động khoảng 3-5%. Ngoài ra, trong lipid tổng của mẫu san hô nghiên cứu còn xuất hiện thêm một số các lớp chất chưa xác định, chiếm một tỉ lệ không cao ($3,16 \pm 0,15\%$) (bảng 2, hình 1).

Bảng 2. Thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid chính của mẫu san hô mềm nghiên cứu (n=3)

STT	Lớp chất	Hàm lượng (%)
1	Pol	24,91 ± 2,55
2	ST	11,32 ± 0,10
3	FFA	3,37 ± 0,15
4	TAG	12,31 ± 0,70
5	MADAG	26,15 ± 2,71
6	HW	18,78 ± 0,80
7	Khác	3,16 ± 0,15



Hình 1. Hình ảnh TLC của lipid tổng mẫu san hô mềm nghiên cứu

Thành phần và hàm lượng axit béo

Bảng 3. Thành phần và hàm lượng axit béo trong lipid tổng mẫu san hô mềm *Capnella* sp.

TT	Axit béo	% tổng axit béo	TT	Axit béo	% tổng axit béo	TT	Axit béo	% tổng axit béo
1	14:0	2,16	11	18:1n-9	2,5	21	22:4n-6	0,24
2	16:2n-7	13,52	12	18:1n-7	0,36	22	24:5n-6	3,18
3	16:1n-9	0,59	13	18:0	6,81	23	24:6n-3	0,91
4	16:1n-7	2,59	14	20:4n-6 AA	9,37	24	DMA	3,31
5	16:0	32,53	15	20:5n-3 EPA	1,71	25	Khác*	0,49
6	18:5n	0,27	16	20:3n-6	0,3	26	AXB n-3	12,75
7	18:5n-3	1,44	17	20:4n-3	1,09	27	AXB n-6	20,19
8	18:4n-3	3,14	18	20:2n-6	0,45	28	AXB no	42,08
9	18:2n-6	6,65	19	20:0	0,58	29	AXB 1 nối đôi	6,04
10	18:2n-7	1,35	20	22:6n-3 DHA	4,46	30	AXB đa nối đôi	48,08

Ở loài *Capnella* sp. các axit béo có hàm lượng cao trong lipid tổng là 16:2n-7 (13,52%), 16:0 (32,53%), 18:2n-6 (6,65%), 20:4n-6 (9,37%), 22:6n-3 (4,46%), 24:5n-6 (3,18%). Kết quả phân tích cho thấy, trong lipid tổng của loài san hô nghiên cứu có mặt các axit béo tetracosapolyenoic 24:5n-6 và 24:6n-3 (tổng hàm lượng 4,09% tổng axit béo) là axit béo đánh dấu điển hình cho san hô mềm (san hô tám ngón) trong sự khác biệt khi so sánh với san hô tạo rạn (san hô sáu ngón) và hydrocoral. Hầu hết trong các loài thuộc bộ Alcyonacea đều có mặt axit béo 24:5n-6 với hàm lượng cao hơn 24:6n-3, còn 24:6n-3 được biết đến là axit tetracosapolyenoic C24 chính trong một số loài thuộc bộ Gorgonacea, Pennatulacea và Sứa [12]. Bên cạnh đó xuất hiện các axit béo đánh dấu cho vi sinh vật cộng sinh có mặt với hàm

lượng đáng kể như 18:5n-3, 18:2n-6, 18:3n-6, 18:4n-3, và 20:4n-3 [13].

Thành phần và hàm lượng các phân lớp chất phospholipid trong lipid tổng

Dịch chiết lipid tổng của mẫu san hô mềm *Capnella* sp. được tiến hành định tính trên bản mỏng 1 chiều và 2 chiều, kết hợp sử dụng các chất chuẩn phospholipid và các thuốc thử đặc hiệu là molybdate và ninhydrin. Phương pháp xác định định tính các phospholipid có mặt trong lipid tổng của mẫu san hô được dựa vào các chất chuẩn và các phương pháp đã được công bố [4-6]. So sánh với chất chuẩn trên TLC 1 chiều và 2 chiều với nhiều hệ dung môi khác nhau và kết hợp với các tài liệu tham khảo đã công bố về các lớp chất phospholipid của san hô, chúng tôi xác định, trong lipid loài san hô

Capnella sp. có mặt các phân lớp phospholipid đặc trưng của động vật ngành Cnidarian là phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), và phosphonolipid (ceramide

aminoethylphosphonate (CAEP)). Sau khi định tính được các phospholipid trong lipid của mẫu san hô mềm, chúng tôi tiến hành phân tích định lượng theo phương pháp của Kostetsky [6]. Kết quả thu được được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Thành phần và hàm lượng các phân lớp phospholipid của mẫu san hô mềm *Capnella* sp.

TT	Các phân lớp phospholipid	<i>Capnella</i> sp.
1	Choline glycerophospholipid (PC)	35,53 ± 1,46
2	Ethanolamine glycerophospholipid (PE)	23,62 ± 2,05
3	Serine glycerophospholipid (PS)	21,13 ± 2,43
4	Ceramide aminoethylphosphonate (CAEP)	10,20 ± 1,67
5	Phosphatidylinositol (PI)	2,08 ± 0,70
6	Khác**	7,45 ± 3,40

Ghi chú: **: Các lysophospholipid, phospholipid ở dạng oxy hóa ...

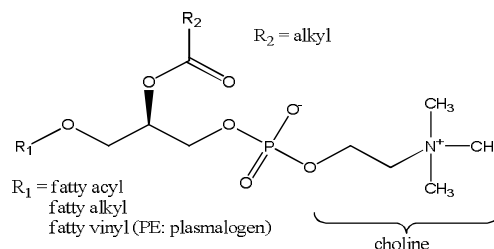
Trong số các phân lớp phospholipid ở mẫu san hô mềm nghiên cứu, chiếm hàm lượng cao nhất là phân lớp phosphatidylcholine (PC) 35,53% của tổng phospholipid. Tiếp theo là hai lớp chất PE và PS, cũng chiếm hàm lượng khá cao trong tổng phospholipid, khoảng hơn 20% cho mỗi phân lớp. Phân lớp CAEP chiếm hàm lượng 10,20% tổng phospholipid. PI chỉ chiếm 2,08%. Ngoài ra các phân lớp lysophospholipid và một số lớp chất phospholipid khác có hàm lượng rất nhỏ nên đôi khi trong phân tích định tính, chúng tôi thực hiện cộng gộp các lớp chất gần nhau để tính toán.

Như vậy, kết quả phân tích định tính và định lượng thành phần phospholipid trong mẫu san hô mềm *Capnella* sp. cũng tương đồng với các công trình nghiên cứu trước đó về thành phần phospholipid trong lipid các loài san hô mềm có chứa vi sinh vật cộng sinh với những phospholipid chính là PC, PE, PS, PI và phosphonolipid chủ yếu là CAEP [14]. Khả năng sinh tổng hợp phosphonolipid cũng từng được nghiên cứu và công bố đối với loài sứa và hải quỳ biển [15, 16], đây là một trong những đặc trưng quan trọng của sự chuyển hóa lipid trong Cnidarian.

Kết quả phân tích dạng phân tử của lớp chất PC

Phân lớp phosphatidylcholine (PC) là phân lớp chiếm hàm lượng cao nhất trong tổng phospholipid. Chúng tôi đã tiến hành phân lập

và nhận dạng các dạng phân tử có mặt trong phân lớp này bằng phổ khối phân giải cao LC-MS IT TOF với độ chính xác cao. Kết quả các tín hiệu đặc trưng tại MS², MS³, cũng như thành phần và hàm lượng các dạng phân tử PC được trình bày ở bảng 5. Công thức phân tử chung được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Cấu trúc hóa học phân tử phosphatidylcholine (PC)

Trên phổ ion dương-MS¹ của PC quan sát thấy tín hiệu của ion dương [M+H]⁺ và trên phổ ion âm tín hiệu của ion [M+CH₃COO]⁻. Ion [M+CH₃COO]⁻ được lựa chọn để thực hiện EIS-HRMS/MS (gọi tắt là MS²). Trên phổ ion âm-MS² của ion [M+CH₃COO]⁻ luôn xuất hiện tín hiệu có cường độ mạnh của ion mảnh [M+CH₃COO-X]⁻, với X = CH₃COOCH₃ (C₃H₆O₂), được hình thành do [M+CH₃COO]⁻ mất đi một mảnh trung hòa C₃H₆O₂. Ion [M+CH₃COO-C₃H₆O₂]⁻ tiếp tục được lựa chọn để thực hiện phân tích MS³, thu được các mảnh ion nhỏ hơn mang lại các thông tin về cấu trúc phân tử của hợp chất PC cần xác định [7].

Bảng 5. Kết quả phân tích dạng phân tử phân lớp phosphatidylcholine (PC) mẫu san hô *Capnella* sp.

ESI-HRMS [M+CH ₃ COO] ⁻ m/z	% trong PC	Khối lượng phân tử M	Công thức phân tử	MS ²		MS ³		Dạng phân tử
				* ion mảnh [M+CH ₃ COO- C ₃ H ₆ O ₂] ⁻ m/z	** ion mảnh m/z	Thành phần		
774,5555	4,81	715,5533	C ₄₀ H ₇₈ NO ₇ P	700,5187	251,1986	C ₁₆ H ₂₈ O ₂ (C16:2n)	PC 16:0e/16:2	
798,5555	4,81	739,5539	C ₄₂ H ₇₈ NO ₇ P	724,5187	275,2011	C ₁₈ H ₂₈ O ₂ (C18:4n)	PC 16:0e/18:4	
800,5711	4,75	741,5688	C ₄₂ H ₈₀ NO ₇ P	726,5440	277,2232	C ₁₈ H ₃₀ O ₂ (C18:3n)	PC 16:0e/18:3	
802,5868	6,76	743,5845	C ₄₂ H ₈₂ NO ₇ P	728,5500	279,2274 251,2078	C ₁₈ H ₃₂ O ₂ (C18:2n) C ₁₆ H ₂₈ O ₂ (C16:2n)	PC 16:0e/18:2	
826,5868	22,03	767,5853	C ₄₄ H ₈₂ NO ₇ P	752,5500	303,2278	C ₂₀ H ₃₂ O ₂ (C20:4n)	PC 16:0e/20:4	
828,6024	5,49	769,5961	C ₄₄ H ₈₄ NO ₇ P	754,5656	277,2145	C ₁₈ H ₃₀ O ₂ (C18:0)	PC 18:0e/18:3	
830,6181	1,74	771,6137	C ₄₄ H ₈₆ NO ₇ P	756,5813	279,233	C ₁₈ H ₃₂ O ₂ (C18:1n)	PC 18:0e/18:2	
854,6181	36,73	795,6001	C ₄₆ H ₈₆ NO ₇ P	780,5906	303,2238	C ₂₀ H ₃₂ O ₂ (C20:4n)	PC 18:0e/20:4	
840,5661	0,51	840,5614	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	766,5340	255,2018 303,2291	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ (C16:0) C ₂₀ H ₃₂ O ₂ (C20:4n)	Diacyl PC 16:0/20:4	
864,5661	0,78	864,5694	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	790,5286	255,2033 279,2299 303,2330	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ (C16:0) C ₁₈ H ₃₂ O ₂ (C18:2n) C ₂₀ H ₃₂ O ₂ (C20:4n)	Diacyl PC 18:2/20:4 Diacyl PC	
866,6181	5,70	808,6068	C ₄₇ H ₈₆ NO ₇ P	792,6003	303,2319	C ₂₂ H ₃₂ O ₂ (C22:6n)	16:0/22:6	
868,5974	0,75	868,5999	C ₄₆ H ₈₄ NO ₈ P	794,5558	283,2641 303,2305	C ₁₈ H ₃₆ O ₂ (C18:0) C ₂₀ H ₃₂ O ₂ (C20:4n)	PC 19:1e/20:4 Diacyl PC 18:0/20:4	

Trên phổ ion âm-MS¹ tín hiệu của ion âm [M+CH₃COO]⁻ có cường độ mạnh nhất tại 2 giá trị m/z 854,6181 và m/z 826,5868, tương ứng với hai dạng phân tử chiếm hàm lượng cao nhất trong phân lớp này. Với tín hiệu của ion tại m/z 854,6181 cho công thức phân tử tương ứng là C₄₆H₈₆NO₇P (khối lượng phân tử tính toán được 795,6001, độ sai lệch 0,00677 so với giá trị đo đạc, số liên kết đôi là 6). Từ công thức phân tử cho thấy, với 7 nguyên tử O trong phân tử hợp chất PC này sẽ ở dạng O-alkyl acylphosphatidylcholine và chỉ chứa trong phân tử 1 axit béo mạch dài. Trên phổ ion âm-MS² của ion [M+CH₃COO]⁻ có xuất hiện tín hiệu tại m/z 780,5906 tương ứng với ion [M+CH₃COO-C₃H₆O₂]⁻. Trên phổ MS³, mảnh ion thu được cho tín hiệu tại m/z 303,2238 tương ứng với anion của axit béo C₂₀H₃₂O₂ (C20:4n). Từ các dữ liệu thu được cho thấy, dạng phân tử của PC với ion cho tín hiệu trên phổ ion âm-MS¹ tại

m/z 854,6181 là phosphatidylcholine PC 18:0e/20:4 (e: ether, thể hiện có mặt mạch alkyl C18). Các tín hiệu thu được trên phổ khối tương đương với các tín hiệu tìm thấy ở chất chuẩn của phân lớp PC [8].

Tương tự như vậy, đối với dạng phân tử chiếm hàm lượng cao thứ 2 trong phân lớp PC của mẫu san hô *Capnella* sp. có tín hiệu của ion âm [M+CH₃COO]⁻ tại m/z 826,5868, cho công thức phân tử tương ứng là C₄₄H₈₂NO₇P (khối lượng phân tử tính toán được 767,5853, độ sai lệch 0,00167 so với giá trị đo đạc, số liên kết đôi là 6). Các tín hiệu của ion âm trên phổ MS² và -MS³ là m/z 752,5500 và 303,2278. Với 7 nguyên tử O trong phân tử, đây cũng là một PC ở dạng O-alkyl acylphosphatidylcholine với axit béo là 20:4n, theo tính toán, mạch alkyl còn lại là 16:0. Dạng phân tử của thành phần phosphatidylcholine này được xác định là PC 16:0e/20:4.

Các thành phần còn lại trong phân lớp PC được xác định tương tự. Kết quả được chỉ ra ở bảng 4. Cần lưu ý dạng phân tử PC với ion âm có tín hiệu tại m/z 802,5868 trên phổ ion âm-MS¹: công thức phân tử tương ứng là C₄₂H₈₂NO₇P với 7 nguyên tử O trong phân tử, như vậy dạng phân tử này chỉ chứa 1 mạch acyl trong phân tử, mạch còn lại là alkyl hoặc alkeny. Trên phổ ion âm MS² thu được ion [M+CH₃COO-C₃H₆O₂]⁻ có tín hiệu tại 728,5500. Khi thực hiện MS³, trên phổ ion âm-MS³ của ion [M+CH₃COO-C₃H₆O₂]⁻ có chứa 2 tín hiệu tại m/z 279,2274 và 251,2078, tương ứng với anion của hai axit béo 18:2n và 16:2n, kiểm tra cho thấy 2 ion này đều là ion mảnh xuất phát từ ion MS² m/z 728,5500. Điều đó cho thấy có hai dạng phân tử PC khác nhau có cùng số khối m/z 802,5978, đó là **PC 16:0e/18:2** và **PC 18:0e/16:2**. Tương tự như vậy, tại tín hiệu có m/z 864,5661 có 2 dạng phân tử là **PC 18:2/20:4** và **PC 16:0/22:6**.

Như vậy, đối với phân lớp PC mẫu san hô mềm *Capnella* sp. xác định được 13 dạng phân tử, trong đó có mặt 4 dạng phân tử ở dạng diacyl phosphatidylcholine là **PC 16:0/20:4**, **PC 18:2/20:4**, **PC 16:0/22:6**, **PC 18:0/20:4**. Trên phổ MS³ của các dạng phân tử dạng diacyl đều thu được các tín hiệu ứng với anion của các axit béo có mặt trong dạng phân tử đó. 9 dạng phân tử *O*-alkyl phosphatidylcholine còn lại có mặt là **PC 16:0e/16:2**, **PC 16:0e/18:4**, **PC 16:0e/18:3**, **PC 16:0e/18:2**, **PC 16:0e/20:4**, **PC 18:0e/18:3**, **PC 18:0e/18:2**, và **PC 18:0e/20:4**.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được hàm lượng lipid tổng của mẫu san hô mềm *Capnella* sp., thực hiện phân tích thành phần, hàm lượng axit béo và các lớp chất lipid, các lớp chất phospholipid trong lipid tổng của mẫu san hô mềm *Capnella* sp.. Kết quả cho thấy lipid tổng có hơn 20 axit béo chính, có mặt các axit béo tetracosapolyenoic 24:5n-6 và 24:6n-3 là axit béo đánh dấu điển hình cho san hô mềm (san hô tám ngón) và các axit béo đánh dấu cho vi sinh vật cộng sinh như 18:5n-3, 18:2n-6, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:4n-3; các lớp chất lipid chính là lipid phân cực (PoL), sterol (ST), axit béo tự do (FFA), triacylglycerol

(TAG), monoalkyldiacylglycerol (MADAG), hydrocarbon và sáp (HW). Lớp chất PoL chiếm hàm lượng cao nhất. Các phân lớp phospholipid chính là phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphonolipid là ceramide aminoethylphosphonate (CAEP), phân lớp PC chiếm hàm lượng cao nhất.

Lần đầu tiên ở Việt Nam, thành phần và hàm lượng các dạng phân tử trong lớp chất phosphatidylcholine (PC) từ loài san hô mềm của Việt Nam được nghiên cứu và công bố, kết quả đã xác định được sự có mặt của 13 dạng phân tử bằng phương pháp phổ khối hiện đại LC-MS IT TOF với độ chính xác cao. Hai dạng phân tử chiếm hàm lượng cao nhất là **PC 18:0e/20:4** và **PC 16:0e/20:4**.

Ở Việt Nam cho đến nay đây là công trình công bố chi tiết đầu tiên về lipid loài san hô mềm *Capnella* sp. và dạng phân tử của phospholipid nói chung và phân lớp phosphatidylcholine nói riêng trong san hô mềm. Với kết quả đạt được sẽ định hướng cho việc phân tích dạng phân tử của các lớp chất phospholipid khác từ các loài san hô Việt Nam, nhằm bổ sung những thông tin mới về khoa học lipid san hô.

Lời cảm ơn: Công trình trên được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí từ Hợp phần số 05 mã số VAST.TĐ.DLB.05/16-18 thuộc dự án KHCN Trọng điểm cấp Viện HLKH&CN Việt Nam và Đề tài VANT16-003, Viện Hàn lâm Khoa học LB Nga (Russian Academy of Sciences, grant VANT16-003).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Quốc Long, Imbs Andrey Borisovich, 2012. Lipit, axit béo và oxylipin của san hô. Nxb. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. Tr. 125-184.
2. Folch, J., Lees, M., and Stanley, G. S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, **226**(1): 497-509.
3. Phattanawasin, P., Sotanaphun, U., Sriphong, L., Kanchanphibool, I., and

- Piyapolrungrroj, N., 2011.* A comparison of image analysis software for quantitative TLC of ceftriaxone sodium. *Silpakorn University Science & Technology Journal*, **5**(1): 7-13.
4. *Svetashev, V. T., and Vaskovsky, V. E., 1972.* A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids. *Journal of Chromatography A*, **67**(2): 376-378.
 5. *Vaskovsky, V. E., and Terekhova, T. A., 1979.* HPTLC of phospholipid mixtures containing phosphatidylglycerol. *Journal of High Resolution Chromatography*, **2**(11): 671-672.
 6. *Kostetsky, E. Y., 1984.* The phospholipid-composition of Spongia, Coelenterata, Plathelminthes, Nemertini, Annelida, Sipunculida and Echiurida. *Biologiya Morya-Marine Biology*, (5), 46-53.
 7. *Imbs, A. B., Dang, L. P., Rybin, V. G., and Svetashev, V. I., 2015.* Fatty acid, lipid class, and phospholipid molecular species composition of the soft coral *Xenia* sp. (Nha Trang bay, the South China Sea, Vietnam). *Lipids*, **50**(6): 575-589.
 8. *Imbs, A. B., Maliotin, A. N., Luru Văn Huyền, Phạm Quốc Long, 2005.* Nghiên cứu thành phần axit béo của 17 loài san hô Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, **43**, 84-91.
 9. *Luru Văn Huyền, 2010.* Nghiên cứu lipid và axit béo của một số loài san hô biển Việt Nam. Luận án Tiến sỹ. Viện Hóa học Các hợp chất thiên nhiên. Tr. 63-64.
 10. *Yamashiro, H., Oku, H., Higa, H., Chinen, I., and Sakai, K., 1999.* Composition of lipids, fatty acids and sterols in Okinawan corals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **122**(4): 397-407.
 11. *Hamoutene, D., Puestow, T., Miller-Banoub, J., and Wareham, V., 2008.* Main lipid classes in some species of deep-sea corals in the Newfoundland and Labrador region (Northwest Atlantic Ocean). *Coral reefs*, **27**(1): 237-246.
 12. *Nichols, P. D., Danaher, K. T., and Koslow, J. A., 2003.* Occurrence of high levels of tetracosahexaenoic acid in the jellyfish *Aurelia* sp.. *Lipids*, **38**(11): 1207-1210.
 13. *Imbs, A. B., Demidkova, D. A., Dautova, T. N., and Latyshev, N. A., 2009.* Fatty acid biomarkers of symbionts and unusual inhibition of tetracosapolyenoic acid biosynthesis in corals (Octocorallia). *Lipids*, **44**(4): 325-335.
 14. *Latyshev, N. A., Nguen, K. H., To, T. N., and Svetashev, V. I., 1986.* Composition and seasonal fluctuations of alcyonarian phospholipids. *Russian Journal of Marine Biology*, **12**, 178-182.
 15. *de Souza, L. M., Iacomini, M., Gorin, P. A., Sari, R. S., Haddad, M. A., and Sasaki, G. L., 2007.* Glyco- and sphingophosphonolipids from the medusa *Phyllorhiza punctata*: NMR and ESI-MS/MS fingerprints. *Chemistry and physics of lipids*, **145**(2): 85-96.
 16. *Mukhamedova, K. S., and Glushenkova, A. I., 2000.* Natural phosphonolipids. *Chemistry of Natural Compounds*, **36**(4): 329-341.

INVESTIGATION OF THE LIPID, PHOSPHOLIPID, FATTY ACID AND PHOSPHATIDYLCHOLINE CONTENT AND COMPOSITION OF THE VIETNAMESE SOFT CORAL *CAPNELLA* SP.

Dang Thi Phuong Ly¹, Tran Quang De³, Pham Minh Quan¹, Dinh Thi Kim Hoa⁵,
Nguyen Thi Theu¹, Luu Thi Hai Linh⁴, Pham Quoc Long¹, Andrey Imbs Borisovich²

¹*Institute of Natural Products Chemistry-VAST*

²*A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation*

³*Can Tho University*

⁴*Hanoi Pedagogy University 2*

⁵*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry*

ABSTRACT: *The total lipid content of the soft coral Capnella sp. contained $1.44 \pm 0.10\%$ of the fresh weight. In the fatty acid content, the tetracosapolyenoic fatty acids 24:5n-6 and 24:6n-3, which were the typical markers for the soft corals (the eight compartment coral), and the fatty acids that marked for symbiotic microorganism including 18:5n-3, 18:2n-6, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:4n-3 were presented. The result of the lipid composition analysis showed that the total lipid contained polar lipid, sterol, free fatty acid, triacylglycerol, monoalkyldiacylglycerol, hydrocarbon and wax. Of these, the polar lipid displayed the highest content with $21.14 \pm 1.17\%$ of the total lipid. The phospholipid composition of the soft coral Capnella sp. contained the characteristic phospholipid subclasses of the animals of the phylum Cnidaria, including phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, and ceramide aminoethylphosphonate (phosphonolipid, CAEP). Of these, phosphatidylcholine exhibited the highest content with $35.53 \pm 1.46\%$ of the total phospholipid. This is the first time that the content and composition of the molecular types of the phosphatidylcholine from a Vietnamese soft coral species have been investigated and reported. By using modern mass spectrometry IT TOF LC-MS, the presence of 13 molecular types have been precisely identified, which **PC 18:0e/20:4** and **PC 16:0e/20:4** were the two ingredients displaying the highest content.*

Keywords: *Total lipid (TL), polar lipid (PoL), non-polar lipid (NL), free fatty acid (FFA), sterol (ST), triacylglycerol (TAG), monoalkyldiacylglycerol (MADAG), hydrocarbon - wax (WE), phosphatidylcholine (PC).*