

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG S-ALLYL-L-CYSTEIN TRONG
TỎI ĐEN LÝ SƠN BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

**Chữ Văn Mến*; Vũ Bình Dương*
Trịnh Nam Trung*; Đào Văn Đôn***

TÓM TẮT

Phương pháp định lượng S-allyl-L-cystein (SAC) trong tỏi đen Lý Sơn bằng phương pháp HPLC đã được xây dựng, bao gồm các điều kiện: cột Optimapak C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 μm); bước sóng phát hiện 210 nm; pha động: H₃PO₃ 0,1%: ACN theo gradient; tốc độ dòng 0,5 ml/phút, thể tích tiêm 10 μl, detector UV. Kết quả thẩm định cho thấy: phương pháp có độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng cao, giới hạn định lượng thấp. Hàm lượng SAC trong tỏi đen Lý Sơn thay đổi theo thời gian lên men và đạt cao nhất sau 35 ngày.

* Từ khóa: Tỏi đen Lý Sơn; S-allyl-L-cystein; Sắc ký lỏng hiệu năng cao.

**DETERMINATION OF S-ALLYL-L-CYSTEINE IN LYSON BLACK GARLIC BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

SUMMARY

A HPLC method for the determination of S-Allyl-L-Cysteine in Lyson black garlic was validated. Using a gradient of acetonitrile and 0.1% H₃PO₄ as the mobile phase and UV detection at 210 nm, optimapak C₁₈ column (150 x 4.6 mm; 5 μm), flow rate: 0.5 ml/min, injection volume: 10 μl. The method was applied to the analysis of SAC in Lyson black garlic. The results showed that the content of SAC in Lyson black garlic was affected by the processing time. The content of SAC in Lyson black garlic increased with the processing time, reached maximum content at 35 day and reduced after this time.

* Key words: Lyson black garlic; S-allyl-L-cysteine; HPLC.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỏi đen là tỏi được lên men tự nhiên trong điều kiện nhiệt độ, độ ẩm thích hợp. Sản phẩm sau khi lên men có màu đen, không có mùi cay hăng, đặc biệt có vị ngọt, có thể sử dụng ngay được [1]. Nhờ công dụng đặc biệt, tỏi đen ngày càng

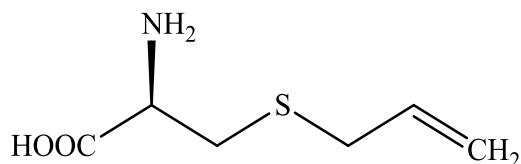
được người tiêu dùng quan tâm và sử dụng trong ẩm thực cao cấp tại các nước Nhật Bản, Hàn Quốc, Mỹ... Các nghiên cứu về thành phần hóa học của tỏi đen cho thấy: sau khi lên men, các hợp chất chứa lưu huỳnh tan trong nước tăng mạnh như: S-allyl-L-cystein, alliin, isoalliin, methiin, cycloalliin [4]. Điều này làm cải thiện

* Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: GS. TS. Nguyễn Liêm

PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

một số hoạt tính sinh học của tỏi đen như khả năng chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch, ức chế tế bào ung thư [2, 3, 5]. Trong số các hợp chất chứa lưu huỳnh, S-allyl-L-cystein (SAC, *hình 1*) là hoạt chất được chú ý nhiều nhất vì có hàm lượng cao [6].



Hình 1: Cấu trúc hóa học của S-allyl-L-cystein (SAC).

Ở Việt Nam, Học viện Quân y đã nghiên cứu lên men tỏi đen từ nguồn tỏi Việt Nam (trong đó có tỏi Lý Sơn, Quảng Ngãi) nhằm tạo sản phẩm mới có giá trị cao, phục vụ chăm sóc sức khỏe cộng đồng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành: *Xây dựng phương pháp định lượng SAC trong tỏi đen Lý Sơn nhằm đánh giá chất lượng các sản phẩm tỏi đen trong quá trình nghiên cứu.*

NGUYÊN LIỆU VÀ THIẾT BỊ, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Mẫu tỏi đen Lý Sơn được lên men trong thời gian khác nhau, lô sản xuất 122011 (do Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất thuốc, Học viện Quân y cung cấp).

- Hóa chất: S-allyl-L-cystein chuẩn (Sigma) độ tinh khiết 99,78%. Acetonitril, methanol, nước cất, axit phosphoric đạt tiêu chuẩn cho sắc ký lỏng hiệu năng cao, các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu bao gồm bơm LC-20AD, detector SPD-20A UV/Vis, hệ thống tiêm mẫu tự động SIL-20A, bộ phận ổn nhiệt CTO-20A (Shimadzu, Japan). Phân tích thực hiện trên cột C₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 μm, Optimapak, RStech Corp, Hàn Quốc).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Xây dựng quy trình định lượng.

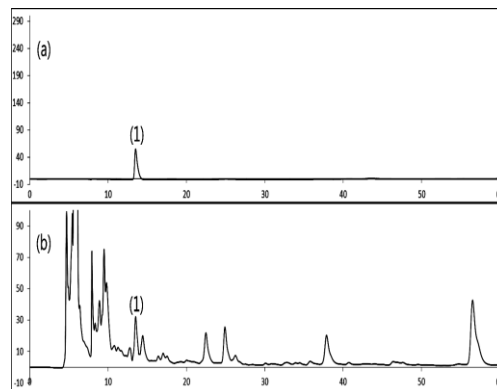
* *Chuẩn bị mẫu chuẩn và thử:*

- Mẫu chuẩn: chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc bằng cách hòa tan SAC vào nước đến nồng độ 1 mg/ml. Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc bằng cách pha loãng dung dịch mẹ SAC đến những nồng độ thích hợp.

- Mẫu thử: cân chính xác 30 g mẫu tỏi, nghiền nhỏ, cho vào bình nón định mức 100 ml, thêm 100 ml nước cất hai lần, chiết siêu âm trong 90 phút ở 40°C, lọc qua màng 0,45 μm, dịch lọc được dùng để tiêm mẫu.

* *Khảo sát điều kiện sắc ký:*

Chúng tôi tiến hành khảo sát với các điều kiện sắc ký: cột optimapak C₁₈ (150 x 4,6; 5 μm); pha động gồm dung dịch axit phosphoric 0,1% trong nước và acetonitrile với các điều kiện rửa giải khác nhau để điều kiện sắc ký thích hợp như sau: 0 phút, 3%B; 50 phút, 4%B; 55 phút, 3%B; 60 phút, 3%B; tốc độ dòng 0,5 ml/phút, thể tích tiêm 10 μl; detector UV bước sóng phát hiện 210 nm.



Hình 2: Sắc ký đồ của chuẩn SAC (a) và mẫu tỏi đen Lý Sơn (b), (1): S-allyl-L-cystein.

Sắc ký đồ thu được cho các pic tách rõ ràng, nhiễu nền thấp, thể hiện qua sắc ký đồ của mẫu thử tỏi đen Lý Sơn và chuẩn. Trên sắc ký đồ, pic mẫu thử có thời gian

lưu trùng với thời gian lưu của pic SAC trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn với thời gian lưu 13,493 phút. Tại thời gian lưu pic SAC, trên sắc đồ mẫu thử và mẫu chuẩn, chúng tôi so sánh phổ hấp thụ UV (bằng cách ghi phổ của bước sóng từ 190 - 400 nm) thu được của pic. Kết quả cho thấy: phổ mẫu thử và mẫu chuẩn trùng khít lên nhau với hệ số phù hợp 0,9998. Điều này chứng tỏ: pic thu được trên sắc ký đồ của mẫu thử tinh khiết và các thành phần khác có trong mẫu thử không ảnh hưởng đến quá trình phân tích SAC.

2. Thẩm định phương pháp định lượng.

* *Tính tương thích của hệ thống sắc ký (System Suitability):*

Đánh giá tính tương thích hệ thống sắc ký bằng cách phân tích 5 lần một mẫu SAC chuẩn trên máy HPLC với cùng điều kiện.

Bảng 1: Kết quả đánh giá tính tương thích của hệ thống sắc ký.

| SAC (100 µg/ml) | THỜI GIAN LƯU (phút) | DIỆN TÍCH PIC |
|--------------------|----------------------|---------------|
| 1 | 13,217 | 996.254,000 |
| 2 | 13,206 | 993.600,000 |
| 3 | 13,218 | 996.757,000 |
| 4 | 13,207 | 996.254,000 |
| 5 | 13,214 | 994.784,000 |
| \bar{x} | 13,212 | 995.529,800 |
| SD | 0,006 | 1.307,220 |
| RSD (%) | 0,042 | 0,131 |
| Hệ số bất đối xứng | | 1,31 |
| Số đĩa lý thuyết | | 2700 |

* *Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:*

Đối với giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), dung dịch chuẩn mẹ được hòa loãng tới những nồng độ thích hợp với nước cất và tiêm vào hệ thống HPLC để phân tích. Đánh giá LOD dựa trên pic thấp nhất có thể phát hiện trên sắc đồ có giá trị tỷ lệ

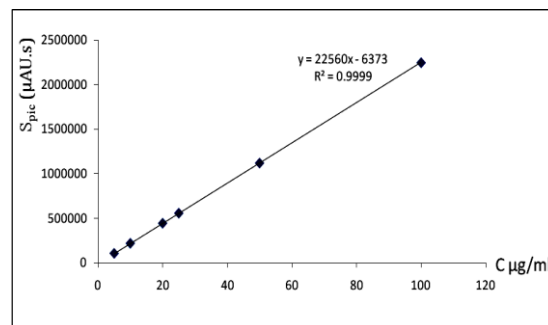
Hệ thống sắc ký tương thích với mẫu phân tích, RSD của diện tích pic và thời gian lưu đều nhỏ hơn 1%.

* *Độ đặc hiệu:*

Sử dụng detector PDA để đánh giá tính đặc hiệu của phương pháp: tại thời gian lưu của pic trên sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu thử, xác định phổ UV. Kết quả cho thấy: phổ mẫu thử và mẫu chuẩn trùng khít lên nhau với hệ số phù hợp 0,9998. Điều này chứng tỏ: pic thu được trên sắc ký đồ của mẫu thử tinh khiết và các thành phần khác có trong mẫu thử không ảnh hưởng đến quá trình phân tích SAC. Vì vậy, có thể ứng dụng để định tính, định lượng SAC trong tỏi đen. Phương pháp có tính chọn lọc tốt, độ đặc hiệu cao.

* *Khoảng tuyến tính:*

Để khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp, chúng tôi tiến hành pha một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 5; 10; 25; 50; 100 µg/ml, sau đó xác định tương quan giữa diện tích pic và nồng độ các dung dịch chuẩn.



Hình 3: Đồ thị tương quan giữa diện tích pic và nồng độ SAC chuẩn.

Trong khoảng nồng độ khảo sát, diện tích pic và nồng độ SAC có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ với nhau ($R^2 = 0,9999$).

tín hiệu/nhiều bằng 3. Đánh giá LOQ dựa trên nồng độ thấp nhất có thể định lượng được có giá trị tín hiệu/nhiều bằng 10. Kết quả khảo sát cho thấy LOD và LOQ của SAC với phương pháp lần lượt là 28,21 ng/ml và 8,46 ng/ml.

*** Độ chính xác:**

Để khảo sát độ chính xác của phương pháp bằng cách thêm lượng xác định chất chuẩn SAC (5,0; 10,0; 25,0 µg/ml) vào mẫu đã biết trước hàm lượng. Chiết và phân tích ngay hỗn hợp. Xác định % tìm lại SAC của các mẫu.

Bảng 2: Tỷ lệ tìm lại của SAC trong các mẫu.

| CHẤT | NỒNG ĐỘ SAC THÊM VÀO (µg/ml) | NỒNG ĐỘ SAC PHÁT HIỆN (µg/ml) | TỶ LỆ TÌM LẠI (%) | RSD (%) |
|------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|---------|
| SAC | 0,0 | 1,91 | - | - |
| | 5,0 | 6,81 | 98,06 | 2,01 |
| | 10,0 | 11,84 | 99,32 | 1,87 |
| | 25,0 | 26,30 | 97,64 | 3,11 |

Phương pháp có độ chính xác cao với % tìm lại từ 97,64 - 98,06% và RSD từ 1,87 - 3,11%.

*** Độ đúng và độ lặp lại:**

Độ đúng và độ lặp lại trong ngày và giữa các ngày thực hiện bằng cách phân tích dung dịch chuẩn 5 lần/ngày và trong 5 ngày liên tiếp.

Bảng 3: Độ đúng và độ lặp lại của SAC (n = 5).

| NỒNG ĐỘ BAN ĐẦU (µg/ml) | TRONG NGÀY (n = 5) | | | GIỮA CÁC NGÀY (n = 5) | | |
|-------------------------|---------------------------|-------------|------------|---------------------------|-------------|------------|
| | Nồng độ phát hiện (µg/ml) | Độ đúng (%) | Độ lặp (%) | Nồng độ phát hiện (µg/ml) | Độ đúng (%) | Độ lặp (%) |
| 50 | 50,45 ± 0,77 | 100,90 | 1,52 | 50,54 ± 1,23 | 101,08 | 2,44 |
| 25 | 25,29 ± 0,23 | 101,16 | 0,89 | 24,94 ± 0,28 | 99,76 | 1,14 |
| 10 | 10,17 ± 0,13 | 101,70 | 1,31 | 10,21 ± 0,35 | 102,10 | 3,43 |

Phương pháp có độ đúng và độ lặp lại trong ngày cũng như khác ngày đạt yêu cầu.

*** Độ ổn định:**

Pha các mẫu chuẩn có nồng độ 100, 50, 10 µg/ml. Định lượng SAC vào những thời điểm 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ngày. Để xác định độ ổn định của mẫu thử tiến hành chiết mẫu, bảo quản và phân tích mẫu đó tại những thời điểm như của mẫu chuẩn.

Bảng 4: Độ ổn định của SAC.

| NGÀY | SAC (4 °C) | | | SAC (25 °C) | | |
|------|------------|----------|----------|-------------|----------|----------|
| | 100 µg/ml | 50 µg/ml | 10 µg/ml | 100 µg/ml | 50 µg/ml | 10 µg/ml |
| 0 | 100,00 | 50,00 | 10,00 | 100,00 | 50,00 | 10,00 |
| 1 | 99,93 | 49,97 | 9,99 | 99,90 | 49,95 | 9,96 |
| 2 | 99,92 | 49,98 | 9,99 | 99,43 | 49,89 | 9,95 |
| 5 | 99,92 | 49,96 | 9,98 | 99,06 | 49,65 | 9,91 |
| 10 | 99,90 | 49,95 | 9,93 | 98,77 | 49,58 | 9,89 |
| 15 | 99,57 | 49,87 | 9,91 | 98,52 | 49,54 | 9,88 |
| 20 | 99,40 | 49,84 | 9,91 | 98,47 | 49,49 | 9,88 |
| 25 | 99,24 | 49,67 | 9,88 | 98,25 | 49,41 | 9,87 |
| 30 | 99,18 | 49,56 | 9,87 | 98,02 | 48,91 | 9,86 |
| * | 0,82 | 0,88 | 1,3 | 1,98 | 2,18 | 1,4 |

(* Tỷ lệ hao hụt cao nhất %)

Mẫu phân tích sau thời gian bảo quản, lượng SAC giảm nhiều nhất 2,18% (nồng độ 50 µg/ml ở 25°C). Như vậy, mẫu tương đối ổn định trong điều kiện bảo quản và đủ tiêu chuẩn để tiến hành phân tích, kể cả mẫu chuẩn và mẫu thử.

3. Định lượng SAC trong tỏi đen Lý Sơn.

Định lượng SAC trong các mẫu tỏi đen Lý Sơn lên men với thời gian khác nhau.

Bảng 5: Kết quả định lượng SAC trong các mẫu tỏi đen Lý Sơn (n = 5).

| STT | THỜI GIAN LÊN MEN (ngày) | HÀM LƯỢNG SAC (µg/g) | p |
|-----|--------------------------|----------------------|---|
| 1 | 0 (tỏi tươi) | 24,22 ± 2,35 | $p_{i-1} < 0,05$ $i = 2, 3, 4, 5, 6$ |
| 2 | 5 | 56,97 ± 3,85 | |
| 3 | 10 | 76,21 ± 4,53 | |
| 4 | 20 | 102,88 ± 6,46 | $p_{j-5} < 0,05$ $j = 1, 2, 3, 4, 6$ |
| 5 | 35 | 129,75 ± 7,18 | |
| 6 | 40 | 99,39 ± 6,24 | |

Hàm lượng SAC trong tỏi tươi thấp hơn so với tỏi sau khi lên men ($p < 0,05$). Như vậy, sau khi lên men, hàm lượng SAC trong tỏi đen đã cải thiện đáng kể. Hàm lượng SAC tăng theo thời gian lên men và đạt cao nhất ở ngày thứ 35 (129,75 µg/g).

KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp định lượng S-allyl-L-Cysteine trong tỏi đen Lý Sơn bằng HPLC với các điều kiện: cột Optimapak C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm); bước sóng phát hiện 210 nm; pha động: H₃PO₃ 0,1%: ACN theo gradient; tốc độ dòng 0,5

ml/phút, thể tích tiêm 10 µl, detector UV. Kết quả thẩm định cho thấy: phương pháp có độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng cao, giới hạn định lượng thấp. Kết quả định lượng SAC trong mẫu tỏi đen Lý Sơn theo phương pháp đã xây dựng cho thấy: hàm lượng SAC thay đổi theo thời gian lên men và đạt cao nhất sau 35 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Montano A, Casado F. J, De Castro A, Sánchez A. H, & Rejano L. Vitamin content and amino acid composition of pickled garlic processed with and without fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, pp.7324-7330.
2. Chu Q. J, Lee D.T.W, Tsao S.W, Wang X.H, Wong Y. C. S-allylcysteine, a water-soluble garlic derivative, suppresses the growth of a human androgenindependent prostate cancer xenograft, CWR22R, under in vivo conditions. *BJU International*. 2007, 99, pp.925-932.
3. Shin J. H, Choi D. J, Lee S. J, Cha J. Y, Kim J. G, Sung N. J. Changes of physicochemical components and antioxidant activity of garlic during its processing. *Journal of Life Science*. 2008, 18, pp.1123-1131.
4. Kodera Y, Suzuki A, Sumioka I, Kanezawa A, Taru N, Fujikawa M. Physical, chemical and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 30, pp.622-632.
5. Sato E, Kohno M, Hamano H. Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2006, 61, pp.157-160.
6. Park S. H, Kim S. H, Kim H. S, Jung Y. K, Kim Y. R, Lee H. Y. Research of S-allyl-(L)-cysteine content changes in aged garlic. In *The 2010 ASABE annual international meeting*. 2010, pp.4506-4512.
7. Herrera-Mundo M. N, Silva-Adaya D, Maldonado P. D, Galvan-Arzate S, Andres-Martinez L, Perez-De La Cruz V. S-allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neuroscience Research*. 2006, 56, pp.39-44.
8. Chuah S. C, Moore P. K, & Zhu Y. Z. S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007, 293, H2693-H2701.

Ngày nhận bài: 7/8/2012

Ngày giao phản biện: 10/10/2012

Ngày giao bản thảo in: 16/11/2012