

Nghiên cứu bào chế dịch chiết tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn

Trần Thị Việt Hằng, Lê Thị Minh Nguyệt, Hồ Hoàng Nhân,

Đào Thị Cẩm Minh, Phan Đăng Trường Thi

Khoa Dược, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề và mục tiêu: Trong những năm gần đây, tỏi đen được sử dụng rất phổ biến ở nước ta vì những tác dụng vượt trội như chống oxy hóa, chống viêm, điều hòa hệ miễn dịch, chống dị ứng, hạ lipid máu, ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư ... Hàm lượng của các hoạt chất có hoạt tính sinh học trong tỏi đen tăng cao so với tỏi trắng, đáng chú ý nhất là S-allyl cysteine (SAC) - hoạt chất chống oxy hóa chính trong tỏi đen. **Mục tiêu:** Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu bào chế tỏi đen và dịch chiết tỏi đen. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Tỏi tươi cô đơn được trồng và thu hoạch tại huyện đảo Lý Sơn-Quảng Ngãi. Khảo sát phương pháp điều chế tỏi đen và các điều kiện ảnh hưởng để bào chế dịch chiết tỏi đen. Đánh giá chất lượng và hàm lượng S-allyl cysteine của tỏi đen và dịch chiết tỏi đen. **Kết quả:** Lựa chọn được phương pháp có cung cấp men bia và ủ ấm trong 25 ngày để bào chế tỏi đen; phương pháp hầm bằng dung môi nước để điều chế dịch chiết tỏi đen với hàm lượng S-allyl cysteine là 396,73µg/g. **Kết luận:** Đã nghiên cứu thành công quy trình bào chế tỏi đen và dịch chiết tỏi đen

Từ khóa: Tỏi đen, S-allyl cysteine, high performance liquid chromatography (HPLC).

Abstract

Study on manufacturing black garlic extract from fresh single garlic

Tran Thi Viet Hang, Le Thi Minh Nguyet, Ho Hoang Nhan,

Dao Thi cam Minh, Phan Dang Truong Thi

Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Background and Objective: In recent years, black garlic has been popularly used in our country because of its outstanding effects such as antioxidant, anti-inflammation, regulating immune system, anti-allergy, lowering blood lipid, inhibiting the growth of cancer cells, ... The content of bioactive substances in black garlic is higher than that in white garlic, especially S-allyl cysteine (SAC) its main active ingredient. **Objectives:** This study was aimed to develop a process to prepare black garlic and its extract. **Materials and Methods:** Fresh garlic was risen and harvested from Ly Son island, Quang Ngai province. The method and the parameters of preparing black garlic and its extract. We investigated by evaluating their SAC content. **Results:** The method of using beer yeast and incubating for 25 days was selected to prepare black garlic; the tunnel method using water was chosen to prepare black garlic extract with SAC content of 396,73µg/g. **Conclusion:** The process of preparing black garlic and its extract have been successfully studied.

Keywords: Black garlic, S-allyl cysteine, high performance liquid chromatography (HPLC).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, con người ngày càng có xu hướng sử dụng các thảo dược có nguồn gốc từ thiên nhiên trong việc tăng cường sức khỏe, bảo vệ cơ thể và phòng chống nhiều bệnh tật. Trong những năm gần đây, tỏi đen được sử dụng rất phổ biến ở nước ta và thu hút sự quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu do những tác dụng vượt trội của nó như chống oxy hóa, chống viêm và tác động điều hòa lên hệ miễn dịch, chống dị ứng, hạ lipid máu, ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư...[4], [5], [6], [8]. Hàm lượng các

hoạt chất có hoạt tính sinh học trong tỏi đen tăng lên đáng kể sau quá trình lên men, đáng chú ý là S-allyl-cysteine. Cách dùng phổ biến nhất của tỏi đen là ăn trực tiếp. Kế thừa nghiên cứu bào chế tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn, việc điều chế dịch chiết từ tỏi đen là một sản phẩm trung gian có thể đưa vào các dạng bào chế khác nhau trong các nghiên cứu tiếp theo. Vì vậy, nhằm phát huy những tác dụng của tỏi đen và giúp việc sử dụng trở nên thuận tiện hơn, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu bào chế dịch chiết tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn”** với 2 mục tiêu:

Địa chỉ liên hệ: Trần Thị Việt Hằng, email: ttvhang@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận bài: 15/3/2021; Ngày đồng ý đăng: 12/7/2021; Ngày xuất bản: 30/8/2021

DOI: 10.34071/jmp.2021.4.9

- Xây dựng quy trình bào chế tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn.

- Xây dựng quy trình bào chế dịch chiết tỏi đen.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Chất chuẩn S-allyl cysteine (>98%, AK Sci - Mỹ).

- Nguyên liệu: Tỏi tươi cô đơn tại đảo Lý Sơn, tỉnh Quảng Ngãi, thu thập từ tháng 2 đến tháng 3 năm 2020.

- Dung môi chiết xuất: cồn, nước. Một số trang thiết bị dùng trong bào chế.

- Hóa chất phân tích: acid 1-heptansulfonic, natri dihydrophosphat, acid orthophosphoric, acetonitril, methanol chuyên dùng cho HPLC (Merck).

- Thiết bị: Máy HPLC Shimadzu LC-20A series 2000, detector DAD. Cột pha tĩnh: HyPURITY C18 (4,6 x15mm, 5 μ m).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xây dựng quy trình bào chế tỏi đen

Khảo sát ảnh hưởng của men bia và thời gian lên men khác nhau trong quá trình bào chế tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn. Từ đó lựa chọn các điều kiện thích hợp để điều chế tỏi đen dựa trên cơ sở định lượng SAC.

Phần định lượng tiến hành trên 3 mẫu, mỗi mẫu sử dụng 30g tỏi đen. Xác định hàm lượng SAC trong tỏi đen.

2.2.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của men bia

Mẫu 1 (TK): Cân 1000g tỏi tươi cô đơn, bọc trong giấy bạc, cho vào nồi ủ ấm ở 70°C [3] trong 25 ngày.

Mẫu 2 (TM): Cân 1kg tỏi tươi cô đơn ngâm ngập trong 1000mL bia trong 30 phút để cung cấp men bia, vớt ra để ráo trong 30 phút, bọc trong giấy bạc, cho vào nồi ủ ấm ở 70°C trong 25 ngày.

Sau 25 ngày thu được 2 mẫu tỏi đen tương ứng. Lấy đồng lượng 30g tỏi đen, nghiền nát bằng chày, cho thêm 200mL nước cất, khuấy đều. Lọc qua bông thu được dịch lọc, đem cô thành cao đặc với đồng khối lượng. Sau đó tiến hành định lượng hàm lượng SAC trong 2 mẫu trên.

2.2.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men trong quá trình bào chế tỏi đen

Chuẩn bị 3 mẫu tỏi tươi cô đơn dựa trên kết quả lựa chọn sau khi khảo sát ảnh hưởng của men bia, (mẫu 1, mẫu 2, mẫu 3) đồng lượng 1kg, bọc trong giấy bạc cho vào nồi ủ ấm ở nhiệt độ 70°C trong các thời gian tương ứng sau: 20, 25, 30 ngày. Sau đó, nghiền 30g mỗi mẫu tỏi đen, phân tán trong 200mL nước cất, lọc qua bông thu dịch lọc, cô thành thể chất cao đặc. Cuối cùng, cân 5g cao đặc mỗi mẫu

tương ứng để định lượng SAC bằng máy HPLC.

2.2.2. Xây dựng quy trình bào chế dịch chiết tỏi đen

Khảo sát các phương pháp chiết xuất khác nhau [1], [2]. Từ đó lựa chọn phương pháp chiết xuất tối ưu dựa trên cơ sở định lượng SAC.

Mỗi phương pháp tiến hành trên 3 mẫu, mỗi mẫu sử dụng 30g tỏi đen. Xác định hàm lượng SAC của các mẫu.

Quy trình bào chế dịch chiết

Chuẩn bị 4 mẫu: 30g tỏi đen/mẫu, nghiền nát trong cối chày, làm ẩm trong 30 phút.

- Mẫu A0: dùng phương pháp hầm với dung môi nước trong thời gian 2 giờ

- Mẫu A5: dùng phương pháp ngâm kiệt với dung môi cồn 50° trong thời gian 72 giờ

- Mẫu A6: dùng phương pháp ngâm kiệt với dung môi cồn 60° trong thời gian 72 giờ

- Mẫu A7: dùng phương pháp ngâm kiệt với dung môi cồn 70° trong thời gian 72 giờ

Sau các thời gian trên, cô các dịch chiết với đồng thể tích đến khi có 4 mẫu cao với khối lượng tương đương. Cuối cùng, cân 5g cao/mẫu để định lượng hàm lượng SAC bằng phương pháp HPLC và cho kết quả như hình 1 và bảng 3.

2.2.3. Xác định hàm lượng SAC trong tỏi đen và cao tỏi đen

2.2.3.1. Xác định hàm lượng SAC trong tỏi đen

Xác định hàm lượng SAC bằng HPLC [9]: Chuẩn bị mẫu: cân chính xác 5g mẫu thử là cao đặc sau khi xử lý như trên đối với tỏi đen vào bình định mức 50mL, thêm hỗn hợp Methanol: H₂O (1:1) vừa đủ đến vạch và siêu âm mẫu cho tan hoàn toàn. Lọc qua màng lọc Ø= 0,45 μ m để tiêm sắc ký. S-allyl cysteine được sử dụng làm đường chuẩn. Pha động bao gồm: kênh A gồm 20mmol/l natri dihydrophosphate và 10mmol/l acid heptansulfonic, pH 2.1 (được điều chỉnh bằng acid orthophosphoric), kênh B: acetonitril. Rửa giải theo chương trình gradient như sau: 0-5 phút, 100-85% A; 5-25 phút, 85-73% A; 25-26 phút, 73-50% A; 26-28 phút, 50% A; 28-30 phút, 50-100% A, 30-50 phút 100% A. Tốc độ dòng 0,8 mL/phút, nhiệt độ cột 40°C.

2.2.3.2. Xác định hàm lượng SAC trong cao tỏi đen

Xác định hàm lượng SAC bằng HPLC [11]: Chuẩn bị mẫu: cân chính xác 5g mẫu thử vào bình định mức 50mL, thêm hỗn hợp Methanol: H₂O (1:1) vừa đủ đến vạch và siêu âm mẫu cho tan hoàn toàn. Lọc qua màng lọc Ø= 0,45 μ m để tiêm sắc ký. S-allyl cysteine được sử dụng làm đường chuẩn. Tiến hành phân tích bằng thiết bị HPLC với điều kiện tiến hành tương tự như phần xác định hàm lượng SAC trong tỏi đen.

2.2.3.3. Công thức xác định hàm lượng SAC trong

mẫu cao đặc, dịch chiết và tỏi đen

* Hàm lượng SAC trong cao đặc được xác định từ kết quả của quá trình định lượng SAC bằng máy HPLC:

$$C(\text{thử}) = S(\text{thử}) * C(\text{chuẩn}) / S(\text{chuẩn})$$

Trong đó:

- C là nồng độ chất ($\mu\text{g/mL}$)

- S là diện tích pic ($\text{mAU} * \text{minutes}$)

* Hàm lượng SAC trong dịch chiết: $Y = m * X / V$

Trong đó:

- V là thể tích dịch chiết của mẫu (mL)

- m khối lượng cao tỏi đen của mẫu (g)

- X là hàm lượng SAC trong cao đặc ($\mu\text{g/g}$)

- Y là hàm lượng SAC trong cao đặc ($\mu\text{g/mL}$)

* Hàm lượng SAC trong tỏi đen: $Z = m * X / 30$

Trong đó:

- m khối lượng cao tỏi đen của mẫu (g)

- X là hàm lượng SAC trong cao đặc ($\mu\text{g/g}$)

- Z là hàm lượng SAC trong tỏi đen ($\mu\text{g/g}$)

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xây dựng quy trình bào chế tỏi đen

3.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của men bia vào quá trình lên men bào chế tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn.

Sau khi thực hiện quy trình chuẩn bị, lên men và định lượng SAC trong tỏi đen, kết quả như bảng 1.

Bảng 1. Kết quả hàm lượng SAC trong tỏi đen

Mẫu	Khối lượng cao tỏi đen (g)	Hàm lượng SAC trong cao đặc ($\mu\text{g/g}$)	Hàm lượng SAC trong tỏi đen ($\mu\text{g/g}$)
TK	$9,60 \pm 0,06$	$348,27 \pm 0,93$	$111,46 \pm 0,60$
TM	$9,81 \pm 0,08$	$420,21 \pm 0,94$	$137,44 \pm 1,34$

Nhận xét: Hàm lượng SAC trong mẫu TM, tỏi đen được lên men có cung cấp men bia cao hơn mẫu tỏi đen được lên men không cung cấp men bia, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Do đó, phương pháp dùng men bia để bào chế tỏi đen được chúng tôi lựa chọn.

3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men bào chế tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn

Khảo sát quy trình lên men bào chế tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn có cung cấp men bia với các thời gian khác nhau.

Bảng 2. Kết quả hàm lượng SAC trong tỏi đen được ủ trong các thời gian khác nhau

Mẫu	Thời gian	Khối lượng cao (g)	Hàm lượng SAC trong cao đặc ($\mu\text{g/g}$)	Hàm lượng SAC trong tỏi đen ($\mu\text{g/g}$)
M20	20 ngày	$9,51 \pm 0,11$	$376,79 \pm 0,87$	$121,16 \pm 0,99$
M25	25 ngày	$9,83 \pm 0,05$	$419,12 \pm 0,39$	$137,44 \pm 1,34$
M30	30 ngày	$9,64 \pm 0,04$	$391,64 \pm 0,48$	$124,17 \pm 2,24$

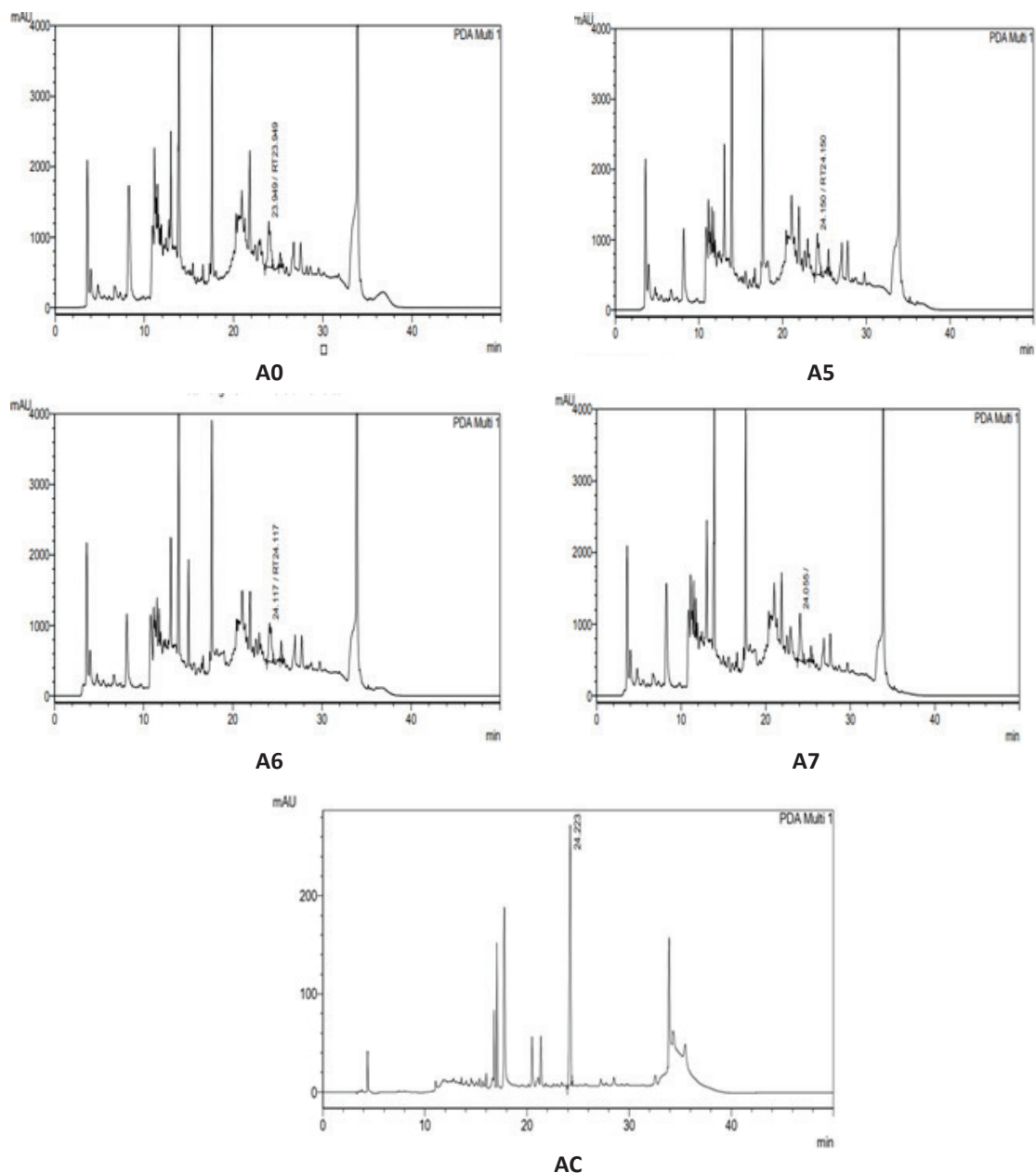
Nhận xét: Hàm lượng SAC trong mẫu tỏi đen được lên men sau 25 ngày là cao nhất, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Do đó thời gian tối ưu để lên men tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn là 25 ngày.

3.2. Xây dựng quy trình bào chế dịch chiết tỏi đen

Tiến hành bào chế dịch chiết bằng các phương pháp chiết xuất khác nhau: hầm bằng nước trong 120 phút, ngâm kiệt bằng cồn 50° , 60° , 70° trong 72 giờ.

Bảng 3. Hàm lượng SAC của tỏi đen được chiết xuất bằng các phương pháp khác nhau

Mẫu	Thể tích dịch chiết (mL)	Khối lượng cao tỏi đen (g)	Hàm lượng SAC trong cao đặc ($\mu\text{g/g}$)	Hàm lượng SAC trong dịch chiết ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng SAC trong tỏi đen ($\mu\text{g/g}$)
A5	1215	$8,79 \pm 0,60$	$341,77 \pm 0,56$	$2,47 \pm 0,23$	$100,18 \pm 1,64$
A6	1197	$8,76 \pm 0,16$	$339,28 \pm 1,03$	$2,48 \pm 0,78$	$99,08 \pm 0,58$
A7	1208	$9,46 \pm 0,23$	$310,53 \pm 0,49$	$2,43 \pm 0,95$	$97,92 \pm 0,96$
A0	1211	$8,68 \pm 0,43$	$396,73 \pm 0,36$	$2,84 \pm 0,64$	$114,78 \pm 2,39$



Hình 1. Sắc kí đồ các mẫu A0, A5, A6, A7 và mẫu chuẩn AC

Nhận xét: Hàm lượng SAC trong dịch chiết tối đen thu được khi hầm bằng nước cao hơn phương pháp chiết xuất khác, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Vì vậy chọn phương pháp bào chế dịch chiết tối đen tối ưu là: hầm tối đen với nước trong 120 phút.

4. BÀN LUẬN

Tỏi tươi cô đơn đã được ủ ấm lên men với sự có mặt của men bia hoặc không có men bia. Quá trình bào chế tỏi đen cho thấy, tỏi đen được bào chế có cung cấp men bia có hàm lượng SAC là $137,44 \pm 1,34 \mu\text{g/g}$, cao hơn đáng kể so với hàm lượng SAC

trong tỏi đen được lên men mà không được cung cấp men bia ($111,46 \pm 0,60 \mu\text{g/g}$). Việc sử dụng men bia trong bào chế tỏi đen có thể đã thúc đẩy quá trình lên men. Ngoài ra, thời gian lên men cũng là một yếu tố ảnh hưởng tới chất lượng tỏi đen. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy hàm lượng SAC

trong tỏi đen trong 25 ngày cao hơn hai thời gian khảo sát còn lại (20, 30 ngày), thời gian này cũng ngắn hơn so với tỏi đen trên thị trường thường được bào chế trong 30 ngày. Theo nghiên cứu của Sang Eun Bae và cộng sự, hàm lượng SAC trong tỏi đen ở Uiseong, Hàn Quốc là 124,67µg/g [7]. Sự khác biệt này là do SAC hình thành trong tỏi đen phụ thuộc vào quá trình lên men và nguồn nguyên liệu tỏi tươi cô đơn [10]. Nguyên liệu tỏi đen cô đơn mà chúng tôi bào chế có hàm lượng SAC nằm trong khoảng hàm lượng của các nghiên cứu khác [7,12].

Tỏi đen cũng chứa nhiều nhóm acid amin quan trọng dễ bị phân hủy ở nhiệt độ 90°C [8] nên chúng tôi chọn khảo sát 2 phương pháp là hầm ở 70°C với dung môi nước trong 2 giờ và ngâm kiệt với dung môi là cồn 50°, 60°, 70° trong 72 giờ để điều chế dịch chiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp hầm bằng nước với thời gian 120 phút có hàm lượng SAC là $2,84 \pm 0,64\mu\text{g/mL}$ dịch chiết tỏi đen, cao hơn so với phương pháp ngâm kiệt bằng

cồn 50°, 60°, 70°. S-allyl cysteine là một hợp chất có hoạt tính sinh học được hình thành trong quá trình thủy phân glutamyl-S-allyl cysteine bằng enzyme-glutamyl transpeptidase, tan tốt trong nước. Ngoài ra, nhiệt độ hầm nằm trong khoảng 60°C-70°C, có thể không ảnh hưởng đến quá trình phân hủy được chất SAC nên để đảm bảo dịch chiết tỏi đen có hàm lượng SAC cao, thuận tiện cho việc nghiên cứu các sản phẩm tiếp theo.

5. KẾT LUẬN

Qua thời gian tiến hành đề tài, chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình bào chế tỏi đen từ tỏi tươi cô đơn có cung cấp men bia trong 25 ngày, dịch chiết tỏi đen được bào chế bằng phương pháp hầm trong nước với thời gian là 120 phút.

Dịch chiết tỏi đen là cơ sở nghiên cứu phát triển sản xuất trên quy mô công nghiệp để tạo ra các dạng bào chế khác và thuận tiện hơn trong việc đáp ứng xu hướng hiện nay của người tiêu dùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ môn bào chế - Trường ĐHY Dược thành phố Hồ Chí Minh (2007), *Bào chế và sinh dược học, tập 1*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr 195, 201, 211-217.
2. Bộ Y tế (2006), *Kỹ thuật bào chế và sinh dược học các dạng thuốc, Tập I*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr 77-82, 114-115, 211-222.
3. Nguyễn Đức Vương, Nguyễn Mậu Thành, Nguyễn Đức Minh (2017), "Nghiên cứu hoàn thiện quy trình lên men tỏi đen từ tỏi trắng", *Tạp chí Thông tin khoa học và công nghệ Quảng Bình*, tr 88-92.
4. Shunsuke K., Yen-C.T., Min H.P., Nan W.S., Ying J.L., Kuan C.C. (2017), "Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application", *Journal of Food and Drug Analysis*, pp 62-70.
5. Xiaoming L., Ningyang L., Xuguang Q., Zhichang Q., Pengli L. (2017), "Composition analysis and antioxidant properties of black garlic extract", *Journal of Food and Drug Analysis*, pp 340-349.
6. Gia Buu Tran, Tan Viet Pham, Ngoc Nam Trinh (2018), "Black Garlic and Its Therapeutic Benefits", *IntechOpen*.
7. Bae, Sang Eun, et al (2014), "Change in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment", *LWT-Food Science and Technology*, pp 397-402.
8. Yukihiro K., Ayumi S., Osamu I., Shigeo K., Isao S., Atsushi K., Nobuo T., Masanori F., Shinji N., Koji M., Katsuhiko M., Kazuhisa O. (2002), "Physical, Chemical, and Biological Properties of S-Allylcysteine, an Amino Acid Derived from Garlic", *Agricultural and Food Chemistry*, pp 622-632.
9. Sang E.B., Seung Y.C., Yong D.W., Seon H.L., Hyun J.P. (2012), A comparative study of the different analytical methods for analysis of S-allyl-cysteine in black garlic by HPLC", *LWT-Food Science and Technology*, pp 532-535.
10. Hanum T., Sinha N., Cash J. (1995). "Characteristics of glutamyl transpeptidase and alliinase of onion and their effects on the enhancement of the enhancement of pyruvate formation in onion macerates". *Journal of Food Biochemistry*, pp 51-65.
11. Ningyang Li, Xiaoming Lu, Houbao Pei, Xuguang (2014), "Effect of Freezing Pretreatment on the Processing Time and Quality of Black Garlic". *Journal of Food Process Engineering* 38
12. Nguyen Ai Thach, Nguyen Minh Thuy (2017), "Effect of extraction conditions on polyphenols, flavonoids, S-allyl cysteine content and antioxidant activity of black garlic extracts". *Vietnam Journal of Science and Technology*.