

Nghiên cứu gốc

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG 5,6-DEHYDROKAVAIN TRONG LÁ CÂY RIỀNG ẤM (*ALPINIA ZEZUMBET*) VÀ BỘT RIỀNG ẤM BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO

Lê Thị Cúc[✉], Lê Hồng Dũng, Nguyễn Văn Sỹ

Viện Dinh dưỡng, Hà Nội

TÓM TẮT

Mục tiêu: Thẩm định phương pháp định lượng 5,6-dehydrokavain (DK) trong lá cây riềng ấm (*Alpinia zezumbet*) và bột riềng ấm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector mảng diod.

Phương pháp: 5,6-dehydrokavain được chiết ra khỏi nền mẫu bằng cách siêu âm trong methanol tại 40 °C; sau đó được tách qua cột C8 với pha động gồm methanol và axit acetic 1%. Thời gian phân tích là 10 phút, detector cài đặt bước sóng phát hiện tại 343 nm. Các thông số thẩm định thực hiện theo hướng dẫn của AOAC 2016.

Kết quả: Khoảng tuyến tính của phương pháp từ 0,05 µg/ml tới 10 µg/ml với hệ số tương quan $r = 1$. Giới hạn phát hiện của 5,6 - dehydrokavain trong nền mẫu lá tươi và bột lá lần lượt là 30,3 µg/100g, 60,6 µg/100g, giới hạn định lượng lần lượt là 100 µg/100g và 200 µg/100g. Phương pháp có độ thu hồi trong khoảng từ 99,7–104,4 %, với độ lặp lại (RSD%) từ 1,0–6,6 %.

Kết luận: Các thông số thẩm định của phương pháp đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của AOAC. Đây là phương pháp đơn giản, đáng tin cậy và có thể sử dụng để nghiên cứu, xác định hàm lượng 5,6 - dehydrokavain trong lá và bột riềng ấm.

Từ khoá: 5,6-dehydrokavain, cây riềng ấm, *Alpinia zezumbet*, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

VALIDATION METHOD FOR DETERMINATION OF 5,6-DEHYDROKAVAIN IN FRESH LEAVES AND LEAF POWDER OF *ALPINIA ZERUMBET* BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Aims: To validate a method to detect 5,6-dehydrokavain concentration in fresh leaves and leaf powder of *Alpinia zerumbet* by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector.

Methods: 5,6-dehydrokavain was extracted by sonication in methanol at 40 °C, then separated by a reversed phase C8 column using a mobile phase including methanol and 1% aqueous acetic acid. The analysis time is 10 minutes and the PDA detector was performed at 343 nm. Validation parameters were performed according to the guidelines of AOAC 2016.

✉ Tác giả liên hệ: Lê Thị Cúc
Email: lethicuc.ninvn@gmail.com
Doi: 10.56283/1859-0381/496

Nhận bài: 16/5/2023 Chính sửa: 18/6/2023
Chấp nhận đăng: 30/6/2023
Công bố online: 3/7/2023

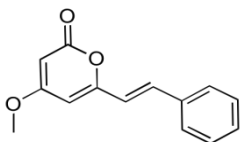
Results: The validated method proved to be linear in the range of 0.05 to 10 $\mu\text{g/ml}$ (correlation coefficient: $r = 1$). The limit of detection in fresh leaves and leaf powder of *Alpinia zerumbet* were $-30.3 \mu\text{g}/100\text{g}$ and $60.6 \mu\text{g}/100\text{g}$, respectively. The limit of quantification in fresh leaves and leaf powder of *Alpinia zerumbet* were $100 \mu\text{g}/100\text{g}$ and $200 \mu\text{g}/100\text{g}$, respectively. The accuracy was within the range from 99,7 to 104.4 %, with the relative standard deviation (RSD%) of 1.0 – 6.6 %.

Conclusion: The validated parameters have met the requirement of Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). This reliable method would be useful for the study and determination of 5,6-dehydrokavain in fresh leaves and leaf powder of *Alpinia zerumbet*.

Keywords: 5,6-dehydrokavain, shell ginger, *Alpinia zerumbet*, high performance liquid chromatography.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Có hai kavalactone chính trong cây riềng ăm (*Alpinia zerumbet*) là dihydro-5,6-dehydrokavain (DDK) và dẫn xuất 5,6-dehydrokavain (DK). Hoạt chất DK có hàm lượng cao nhất trong thân rễ và thấp nhất trong lá [1]. Tuy nhiên, sự thay đổi về lượng kavalactone được biết đến giữa lá, thân và thân rễ, tùy thuộc vào vị trí phát triển và thời gian thu hoạch trong năm [1]. Hàm lượng DK tính trên trọng lượng tươi trong lá, thân và thân rễ lần lượt là 10,0 mg/g; 20,0 mg/g và 100,0 mg/g [1]. Cấu trúc hóa học của 5,6-dehydrokavain thể hiện ở hình 1 [1].



Hình 1. Cấu trúc hóa học của 5,6-dehydrokavain (DK)

Ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về các hoạt chất có từ lá cây riềng ăm cũng như chưa có nghiên cứu nào tìm hiểu sự khác nhau về hàm lượng hoạt chất DK trong lá cây Riềng ăm ở giai đoạn sinh trưởng khác nhau (lá non, lá bánh trê, lá già) và vào các mùa khác nhau trong năm.

Trên thế giới, hầu hết các nghiên cứu đã công bố sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng (HPLC) với detector UV-VIS [1–4], một số ít nghiên cứu sử dụng kỹ thuật sắc ký khí GC/MS [5,6] để xác định DK.

Bột lá cây Riềng ăm giúp phòng ngừa các bệnh mạn tính liên quan đến rối loạn chuyển hóa và tăng cường sức đề kháng, kích thích tiêu hóa giúp ăn ngon miệng, cải thiện các bệnh nhiễm khuẩn [7–10]. Trung tâm y học Makise Clinic & Makise Lifeup Laboratory, Nhật Bản đã nghiên cứu quy trình trồng với quy mô lớn và sản xuất ra hai sản phẩm từ cây riềng ăm là Jipang Ginger và Shell Ginger tại vùng đảo Okinawa. Sản phẩm này đã được sử dụng hiệu quả tại Nhật Bản và đã được bán ở thị trường Âu Mỹ. Hiện nay, tại Việt Nam, Viện Nghiên cứu phát triển Vùng đã bước đầu nghiên cứu tuyển chọn giống, vùng nguyên liệu và thí nghiệm trên quy mô nhỏ, để tạo ra lá cây riềng ăm. Để đảm bảo chất lượng nguồn nguyên liệu và phát triển các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe, việc xây dựng kỹ thuật định lượng các hoạt chất trong lá và bột ngay tại Viện Dinh dưỡng là rất cần thiết, một trong số đó là hoạt chất 5,6-dehydrokavain.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu phân tích

Lá: lá non, lá bánh tẻ, lá già. Lá non là 3 lá từ trên ngọn xuống. Lá già là 3-4 lá từ dưới gốc lên. Lá bánh tẻ là 4-5 lá nằm giữa lá non và lá già. Lá lấy theo mùa được tính như sau: mùa hè (tháng

4-6), mùa thu (tháng 7-9) tính theo dương lịch.

Bột: bột từ lá cây riêng ầm (theo từng giai đoạn trong quy trình chế biến bột).

2.2. Hóa chất và thiết bị

Hóa chất

Chất chuẩn: 5,6-dehydrokawain, PAF receptor binding inhibitor (abcam[®], Hoa Kỳ), độ tinh khiết > 98 %, bảo quản ở -20 °C.

Các hóa chất axit acetic, methanol, acetonitril sử dụng loại tinh khiết phân tích (PA, >99,9%).

Dung dịch chuẩn gốc 1000 µg/ml: cân chính xác khoảng 10,0 mg chất chuẩn, hòa tan bằng methanol và định mức trong bình định mức 10 ml. Bảo

quản dung dịch ở nhiệt độ -49 °C đến khi dùng.

Dung dịch chuẩn trung gian 100 µg/ml: hút 1ml dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng methanol. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ -49 °C đến khi dùng.

Dung dịch chuẩn làm việc: dãy chuẩn làm việc có nồng độ 0,05; 0,01; 0,5; 1; 5; 10 µg/ml được pha từ dung dịch chuẩn trung gian trong methanol. Dung dịch chuẩn làm việc pha mới và chỉ sử dụng trong ngày.

Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống máy HPLC Waters Alliance gồm bơm Water 2695 và bộ phận bơm mẫu tự động - Detector Diode Array 2998 (Mỹ) với phần mềm Empower software.

Cân phân tích ME 204T/00 của hãng Mettler Toledo, máy siêu âm Elmasonic

S80H (Đức), máy lắc vortex Thermolyne (Mỹ), máy ly tâm Hettich (Đức).

Các dụng cụ thông thường khác của phòng thí nghiệm: bình định mức, pipet tự động, cốc có mỏ, ống đong, phễu, vial 2 ml.

2.3. Xử lý mẫu và phân tích sắc ký

Quy trình xử lý mẫu

Mẫu lá hoặc bột đã đồng nhất, cân chính xác khoảng 1g (đối với lá tươi) hoặc 0,5 g (đối với bột lá) vào ống ly tâm 50 ml, sau đó thêm khoảng 30 ml methanol. Lắc đều hỗn hợp, siêu âm 15 phút đối với bột lá hoặc 30 phút với lá tươi (40 °C). Ly tâm, thu dịch chiết vào

bình định mức 100 ml. Chiết lại tủa rắn 2 lần với 30 ml methanol. Gộp dịch chiết vào định mức 100 ml, định mức tới vạch bằng methanol. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm vào lọ đựng mẫu và bơm vào hệ thống HPLC.

Điều kiện sắc ký

Mẫu được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao trên máy HPLC-PDA (hãng Waters, model Alliance 2690/2996, USA) gồm pha tĩnh (cột C8 Inertsill® (35 μ m, 4,6 \times 150

mm), nhiệt độ cột: 35°C), pha động [(chế độ đẳng dòng methanol - axit acetic 1 % (50 – 50)] với Detector (PDA bước sóng 343 nm); thể tích tiêm mẫu: 10 μ l; tốc độ dòng: 1 ml/phút.

2.4. Thẩm định phương pháp

Các thông số thẩm định thực hiện theo hướng dẫn của AOAC 2016 [11] bao gồm:

Tính chọn lọc: Xác định bằng cách so sánh phổ PDA và thời gian lưu của dung dịch chuẩn với mẫu thử tiến hành có chứa DK.

Khoảng tuyến tính: Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 0,05; 0,01; 0,5; 1; 5; 10 μ g/ml. Tiến hành bơm vào hệ thống HPLC để xác định tín hiệu đo của DK. Xây dựng phương trình hồi quy và xác định hệ số tương quan r.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Phân tích mẫu trắng có thêm một lượng chuẩn rất nhỏ. Từ sắc ký đồ thu được, LOD là giá trị nồng độ mà tại đó tín hiệu đo lớn hơn

gấp 3 lần nhiễu đường nền (S/N=3), LOQ là giá trị nồng độ mà tại đó tín hiệu đo lớn hơn gấp 10 lần nhiễu đường nền (S/N=10).

Độ lặp lại (độ chính xác trong cùng điều kiện định lượng): Tiến hành 7 phép thử song song trên một mẫu trắng nạp chuẩn (mỗi lần bắt đầu từ cân mẫu) ở các mức nồng độ thấp, trung bình và cao. Đánh giá sự phân tán số liệu dựa vào giá trị độ lệch chuẩn tương đối RSD_r (%).

Độ thu hồi: xác định bằng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu trắng. Lượng chuẩn thêm vào ở 3 mức nồng độ: nồng độ thấp, nồng độ trung bình, nồng độ cao. Tại mỗi mức nồng độ, phân tích lặp lại 7 lần. Tính tỷ lệ thu hồi R (%) của hoạt chất DK thêm vào mẫu thử.

2.5. Ứng dụng quy trình

Thực hiện phân tích hàm lượng 5,6-dehydrokavain trong một số mẫu lá tươi và bột lá cây riêng ẩm. Nguyên liệu do Trung tâm Thực phẩm dinh dưỡng - Viện Dinh dưỡng cung cấp, gồm: (i) 6 lá riêng ẩm bao gồm 3 loại lá (lá non, lá

bánh tẻ, lá già), lấy vào 2 mùa Hè (tháng 4–6) và Thu (tháng 7–9) và (ii) 4 mẫu bột bán thành phẩm do Trung tâm Thực phẩm dinh dưỡng chế biến theo các công đoạn khác nhau.

2.6. Xử lý số liệu

Kết quả phân tích được xử lý bằng phần mềm Empower software đi kèm theo hệ thống HPLC và tính toán bằng

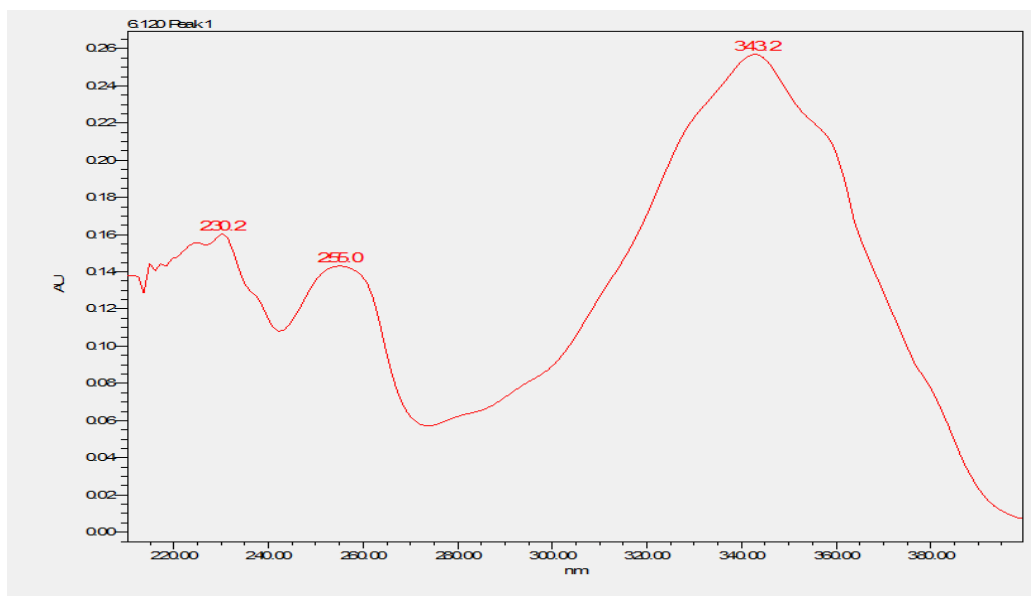
Excel. Kết quả các thông số thẩm định phương pháp được đánh giá dựa theo tiêu chuẩn AOAC 2016 [11].

III. KẾT QUẢ

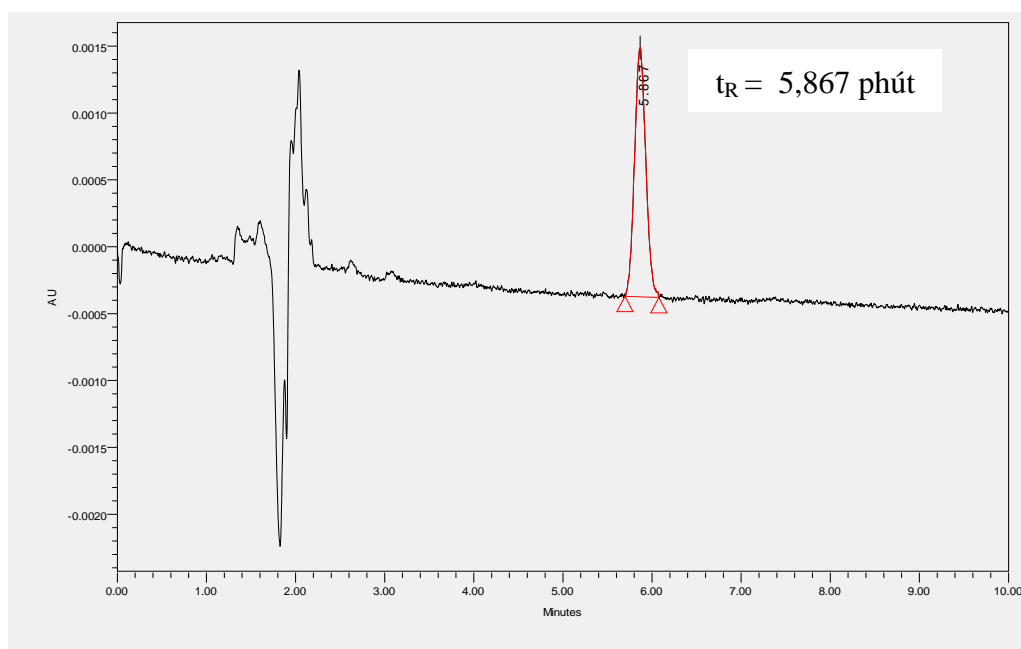
3.1. Độ đặc hiệu

Kết quả phân tích ở Hình 2 cho thấy chất DK có đỉnh hấp thụ tại 343 nm, thời gian lưu của dung dịch chuẩn và mẫu

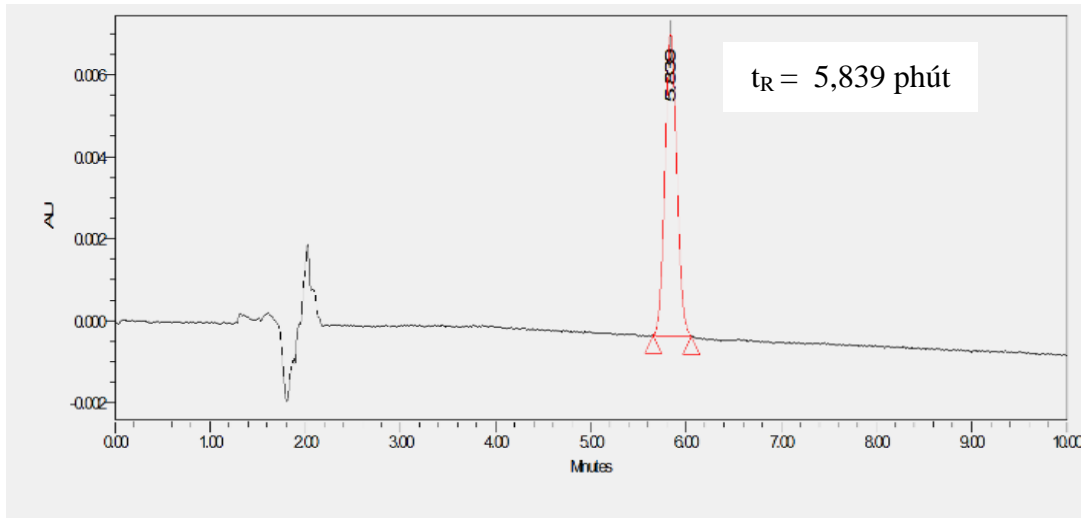
trắng nạp chuẩn tương tự nhau do vậy phương pháp có độ đặc hiệu tốt.



Hình 2a. Phổ PDA của 5,6-dehydrokavain



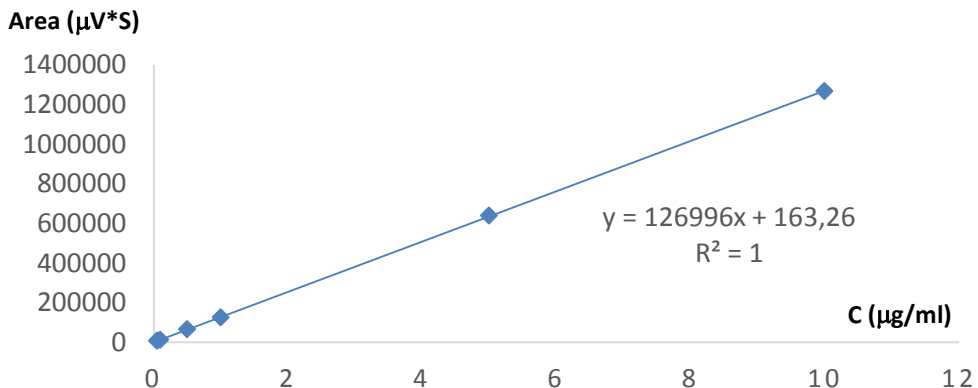
Hình 2b. Sắc ký đồ của chuẩn 5,6-dehydrokavain 0,5 µg/ml



Hình 2c. Sắc ký đồ của mẫu trắng nạp chuẩn.

3.2. Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính của DK từ 0,05–10 $\mu\text{g/ml}$ với hệ số tương quan $r = 1$ cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa đáp ứng phân tích và nồng độ của hoạt chất (Hình 3).



Hình 3. Đồ thị khoảng tuyến tính của 5,6-dehydrokavain.

3.3. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn phát hiện của 5,6-dehydrokavain trong nền mẫu lá tươi, bột lá lần lượt là 30,3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ và 60,6 $\mu\text{g}/100\text{g}$; giới hạn định lượng lần lượt là 100 $\mu\text{g}/100\text{g}$ và 200 $\mu\text{g}/100\text{g}$.

3.4. Độ lặp lại, độ thu hồi

Kết quả Bảng 1 cho thấy:

Độ lặp lại ở 3 mức nồng độ 0,2 mg/100g, 10 mg/100g, và 20 mg/100g có giá trị RSD (%) nằm trong khoảng từ 1,0–6,6 %, đáp ứng theo yêu cầu của AOAC 2016 [11].

Độ thu hồi ở 3 mức nồng độ 0,2 mg/100g, 10 mg/100g, và 20 mg/100g có giá trị R (%) nằm trong khoảng từ 99,7–104,4 %, đáp ứng theo yêu cầu của AOAC 2016 [11].

Bảng 1. Kết quả xác định độ lặp lại, độ thu hồi của 5,6-dehydrokavain

Mức nồng độ	RSD _r (%)	R (%)
Nồng độ thấp: 0,20 mg/100g (n=7)	6,6	99,7
Nồng độ trung bình: 10 mg/100g (n=7)	1,0	104,4
Nồng độ cao: 20 mg/100g (n=7)	3,8	101,8

3.5. Ứng dụng phân tích mẫu thực tế

Kết quả Bảng 2 cho thấy hàm lượng 5,6-dehydrokavain là khác nhau giữa các loại lá, khác nhau giữa các cách chế biến bột lá.

Với mẫu lá tươi, hàm lượng DK trong lá non được thu hoạch vào mùa hè

là cao nhất (14,9 mg/100g). Vào mùa thu, hàm lượng hoạt chất DK có trong ba loại lá không khác biệt nhau nhiều.

Với mẫu bột lá, hàm lượng DK trong mẫu bột không ngâm sấy là cao nhất (15,1 mg/100g).

Bảng 2. Hàm lượng 5,6-dehydrokavain trong lá tươi và bột lá cây riêng ẩm

Các loại mẫu	Hàm lượng (mg/100g)	
	Mùa hè (tháng 4–6)	Mùa thu (tháng 7–9)
Mẫu lá tươi		
Lá non	14,9	4,7
Lá bánh tẻ	4,7	3,3
Lá già	3,7	5,9
Mẫu bột lá		
Bột không ngâm sấy	15,1	
Bột ngâm sấy	5,9	
Bột nghiền	13,7	
Bột tiệt trùng	12,6	

IV. BÀN LUẬN

4.1. Phương pháp xử lý mẫu

Mẫu lá và bột riêng ẩm được chiết bằng Methanol. Phương pháp xử lý mẫu này có ưu điểm: Đơn giản, tốn ít dung môi hóa chất, thời gian phân tích hợp lý,

thiết bị thông dụng, dễ thực hiện trong phòng thí nghiệm ở Việt Nam, dễ triển khai, tiết kiệm chi phí.

4.2. Điều kiện sắc ký HPLC

Ưu điểm: Điều kiện sắc ký tương đối đơn giản và cho khả năng tách tốt hoạt chất 5,6-dehydrokavain trong mẫu. Đồng thời phương pháp HPLC là phương pháp hiện đại được ứng dụng rộng rãi trên thế giới và ở Việt Nam do có những ưu điểm nổi trội về độ ổn định, độ chính xác cao.

Việc đánh giá phương pháp qua những tiêu chí thẩm định phương pháp cho thấy chương trình HPLC đã xây dựng là đáng tin cậy. Ngoài ra, đa số các trung tâm kiểm nghiệm và cơ sở sản xuất hiện nay đều có hệ thống HPLC, có thể triển khai và ứng dụng phương pháp vào thực tế.

4.3. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Với mẫu lá tươi, ta thấy hàm lượng DK trong lá non được thu hoạch vào mùa hè là cao nhất (14,9 mg/100g). Vào mùa thu, hàm lượng hoạt chất DK có trong ba loại lá không khác biệt nhau nhiều. Điều này cũng giải thích rằng vào mùa hè với lượng ánh sáng nhiều, cây lấy đầy đủ chất dinh dưỡng từ ánh sáng mặt trời, lá tiếp xúc ánh sáng mặt trời nhiều nhất là lá non nên hàm lượng DK là cao nhất.

Với mẫu bột lá, hàm lượng DK trong mẫu bột không ngâm sấy là cao nhất

(15,1 mg/100g). Hàm lượng thấp nhất là mẫu bột ngâm sấy (5,9 mg/100g). Điều này giải thích với mỗi cách chế biến khác nhau sẽ gây ra cá tác động khác nhau, ảnh hưởng tới hàm lượng hoạt chất sau khi xử lý.

Các đánh giá này cần tiếp tục được tiến hành và giám sát trong các nghiên cứu, khảo sát tiếp theo với số lượng mẫu lớn hơn nhằm chọn được nguồn nguyên liệu tối ưu.

V. KẾT LUẬN

Xây dựng được quy trình chiết mẫu, điều kiện sắc ký để phân tích 5,6-dehydrokavain trong lá tươi và bột riêng ẩm. Phương pháp được thẩm định đầy đủ các thông số gồm độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn

định lượng, độ lặp lại, độ thu hồi cao. Phương pháp đơn giản, dễ thực hiện, có thể triển khai rộng rãi tại các phòng thí nghiệm của Việt Nam có thiết bị HPLC-PDA.

Tài liệu tham khảo

1. Xuan TD, Teschke R. Dihydro-5,6-dehydrokavain (DDK) from *Alpinia zerumbet*: Its isolation, synthesis, and characterization. *Molecules*. 2015;20:16306–16319.
2. Pham Thi Be Tu and Shinkichi Tawata. Anti-Obesity Effects of Hispidin and *Alpinia zerumbet* Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecules*. 2014;19:16656-16671. Doi:10.3390/molecules191016656.
3. Yen Thi Kim Nguyen, Jeong Yong Moon, Jiyeon Ryu, Sangmi Eum, Tran The Bach and Somi Kim Cho. Methanol Extract of Aerial Parts of *Pavetta indica* L. Enhances the Cytotoxic Effect of Doxorubicin and Induces Radiation Sensitization in MDA-MB 231 Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Molecules*. 2019;24:2273. Doi:10.3390/molecules24122273.

4. Rao YK, Shih HN, Lee YC, Cheng WT, Hung HC, Wang HC, Chen CJ, Tzeng YM, Lee, MJ. Purification of kavalactones from *Alpinia zerumbet* and their protective actions against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *J Biosci Bioeng.* 2014;118:679–688.
5. Fuad Ali Tarbah. Analytical studies on the kavain metabolism in human specimen and liver cell lines. Dissertation zur forensischen Toxikologie - PhD Thesis in Forensic Toxicology. *T + K 71.* 2004;(2):89. <https://d-nb.info/970019947/34>.
6. Viorica Lopez-Avila and George Yefchak. Identification of Compounds in Commercial Kava Extracts by Gas Chromatography with Electron Ionization High-Resolution Mass Spectrometry. *The Open Analytical Chemistry Journal.* 2009;3:22-31.
7. Cristiane P. Victório, Daniela S. Alviano, Celuta S. Alviano, Celso L. S. Lage. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. *Rev brasfarmacogn.* 2009;19(3). Doi: 10.1590/S0102-695X2009000500008.
8. Lahlou S, Galindo CA, Leal-Cardoso JH, Fonteles MC, Duarte GP. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, Terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. *Planta Med.* 2002;68(12):1097-1102. Doi: 10.1055/s-2002-36336.
9. Makise T, et al. Analyses of expression of “Sirt 1” gene of mouse by Jipang Ginger (fermented *Alpinia Zerumbet*. Transgenic INC. 2014.
10. Upadhyay A, Makise T. Change in gene expression by *Alpinia* leaf extract”. University of the Ryukyus. 2012.
11. AOAC Official methods of Analysis (2016), Appendix F. Guideline for standard method performance requirements.