

XÁC ĐỊNH COUMARIN, CINNAMYL ALCOHOL, CINNAMALDEHYD, ACID CINNAMIC, EUGENOL, CINNAMYL ACETAT, ACID 2-HYDROXYCINNAMIC TRONG QUẾ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Lê Việt Ngân^{1,2*}, Lê Đình Chi², Nguyễn Thị Hồng Anh¹, Nguyễn Bích Ngọc¹
Nguyễn Thị Phương Lan³, Nguyễn Thị Minh Lợi⁴, Lê Thị Hồng Hảo¹

¹Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

²Trường Đại học Dược Hà Nội

³Cục An toàn thực phẩm

⁴Trường Đại học Quảng Bình

(Ngày đến tòa soạn: 14/01/2020; Ngày sửa bài sau phản biện: 21/02/2020; Ngày chấp nhận đăng: 10/03/2020)

Tóm tắt

Nghiên cứu được tiến hành để tối ưu hóa phương pháp HPLC-PDA xác định đồng thời coumarin, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyd, acid cinnamic, eugenol, cinnamyl acetat, acid 2-hydroxycinnamic trong nền mẫu quế và thực phẩm chứa quế. Các chất được chiết ra khỏi nền mẫu bằng methanol, lắc tại nhiệt độ phòng trong 30 phút và được xác định bằng HPLC-PDA với các điều kiện sau: cột C18 sunfire (250 x 4,6 mm, 5 µm), pha động amoni acetat 30 mM và hỗn hợp methanol-acetonitril (50 : 50) theo chương trình gradient. Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đường chuẩn tuyến tính trong khoảng từ 0,1 - 100 µg/mL, độ thu hồi trong khoảng 80 - 107%, độ lặp lại có RSD < 7,3%, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của acid 2-hydroxycinnamic, coumarin, cinnamaldehyd, cinnamyl alcohol, eugenol lần lượt là 1,0 µg/g và 3,3 µg/g; LOD và LOQ của acid cinnamic, cinnamyl acetat lần lượt là 2,0 µg/g và 6,7 µg/g, đáp ứng yêu cầu của AOAC. Phương pháp đã được áp dụng để sơ bộ đánh giá hàm lượng các chất trong một số mẫu quế, thực phẩm và thực phẩm chức năng (TPCN) chứa quế.

Từ khóa: coumarin, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyd, acid cinnamic, eugenol, cinnamyl acetat, acid 2-hydroxycinnamic, HPLC, PDA, quế, cinnamon.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quế (*Cinnamomum*) là một chi các loài thực vật thuộc họ long não (Lauraceae). Quế là một trong những loại gia vị quan trọng được sử dụng hàng ngày trên khắp thế giới. Quế chủ yếu chứa các loại dầu quan trọng, như cinnamaldehyd, acid cinnamic và cinnamat. Ngoài việc là một chất chống oxy hóa, chống viêm, trị đái tháo đường, kháng khuẩn, chống ung thư, hạ lipid và hỗ trợ điều trị bệnh tim mạch, quế còn được báo cáo có khả năng chống lại các rối loạn thần kinh, như bệnh Parkinson và Alzheimer [10]. Quế (*Cinnamomum*) là một loại gia vị phổ biến đặc biệt, được sử dụng cho bánh quy, bánh ngọt, được bổ sung trong thực phẩm chức năng và sử dụng nhiều trong đông y. Loài quế ở Việt Nam chủ yếu là loài *C. cassia* có chứa nhiều coumarin hơn so với loài *C. verum* có nguồn gốc từ Srilanka và phía nam Ấn Độ [6].

Các hợp chất có trong quế có nhiều tác dụng tốt như: Cinnamaldehyd và một số dẫn xuất cinnamaldehyd được tổng hợp từ acid cinnamic, chẳng hạn như 2'-hydroxycinnamaldehyd có tác dụng ức chế nhất đối với sản sinh NO trong tế bào [11]; eugenol có tác dụng trên các bệnh hen suyễn, tác dụng chống hen, dị ứng, tác dụng chống dị ứng, viêm, chống viêm, đáp ứng miễn dịch, tế bào lympho, cytokine, immunoglobulin, điều hòa miễn dịch và chống oxy hóa [7].

Bên cạnh các tác dụng tốt của các chất trong quế, thì coumarin là một chất có khả năng gây độc cho gan và gây ung thư. Có rất nhiều dữ liệu thí nghiệm về coumarin có độc tính trên gan của

* Điện thoại: 0388 288 081 Email: nganbmt113@gmail.com

động vật và cũng có dữ liệu lâm sàng về nhiễm độc gan trên người từ các bệnh nhân được điều trị bằng coumarin. Dựa trên các dữ liệu sẵn có, cơ quan an toàn thực phẩm Châu Âu đã khuyến nghị liều hàng ngày dung nạp được (TDI) của coumarin là 0,1 mg/kg trọng lượng cơ thể [2].

Đã có nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới về các chất trong các loài quế và trong các loại thực phẩm khác nhau. Các phương pháp được sử dụng đa dạng có thể đề cập đến như: HPLC-PDA, LC-MS/MS,... Tuy nhiên, tại Việt Nam hiện chưa có phương pháp tiêu chuẩn để xác định đồng thời coumarin và các dẫn xuất của nó trong thực phẩm và thực phẩm chức năng có thành phần quế.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm coumarin, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyd, acid cinnamic, eugenol, cinnamyl acetat, acid 2-hydroxycinnamic. Đối tượng mẫu: quế, thực phẩm và thực phẩm chức năng chứa quế được lấy ngẫu nhiên tại các chợ, cửa hàng ở Hà Nội.

2.2. Hóa chất

- Chất chuẩn eugenol (Sigma - Adrich, $\geq 99\%$), coumarin (Sigma - Adrich, số lô: W526509; $\geq 98\%$), trans-cinnamaldehyd (Sigma - Adrich, số lô: C80687; $\geq 99\%$), acid 2-hydroxycinnamic (Sigma - Adrich, số lô: H22809; $\geq 97\%$), acid trans-cinnamic (Sigma - Adrich, số lô: C80857; $\geq 99\%$), cinnamyl alcohol (Sigma - Adrich, số lô: 108197; $\geq 98\%$), cinnamyl acetat (Sigma - Adrich, số lô: 166170; $\geq 99\%$).

- Dung môi loại tinh khiết cho HPLC: CH₃OH, CH₃CN, HCl, CH₃COOH, CH₃COONH₄, C₂H₅OH (Merck).

2.3. Thiết bị và dụng cụ

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Waters (Acquity H-class) trang bị detector PDA, cột sắc ký Sunfire C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) và các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Mẫu quế và thực phẩm được xay nhỏ, được sàng qua rây 0,5 mm. Mẫu lỏng được lắc đều trước khi tiến hành nghiên cứu.

Dựa vào khả năng hòa tan của các chất phân tích và tham khảo các tài liệu [3, 8, 10, 12] chúng tôi khảo sát khả năng chiết các chất trong quế từ nền mẫu bằng dung môi (CH₃CN, CH₃OH, C₂H₅OH, H₂O), sử dụng nhiệt độ phòng (25°C), 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, lắc trong thời gian 10 phút, 20 phút, 30 phút, 40 phút, 50 phút, 60 phút.

2.4.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Từ các tài liệu tham khảo [3, 8, 10, 12] và theo tình hình thực tế của phòng thí nghiệm, cột sắc ký Sunfire C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) được lựa chọn cố định pha tĩnh. Khảo sát bước sóng cực đại của các chất, dung môi phân tích sắc ký và chương trình dung môi.

2.4.3. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp đã tối ưu các thông số cơ bản gồm tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, đường chuẩn, độ lặp lại và độ thu hồi. Các kết quả được đánh giá so sánh với các quy định theo AOAC.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Thiết lập điều kiện phân tích sắc ký trên HPLC

3.1.1. Xác định bước sóng phát hiện

Để lựa chọn bước sóng thích hợp ghi sắc ký đồ khi phân tích đồng thời coumarin, cinnamyl

alcohol, cinnamaldehyd, acid cinnamic, eugenol, cinnamyl acetat, acid 2-hydroxycinnamic, detector PDA được lựa chọn để phát hiện, quét phổ trong khoảng 190 - 400 nm, chọn bước sóng hấp thụ cực đại hấp thụ cho mỗi chất và thu được kết quả như bảng 1.

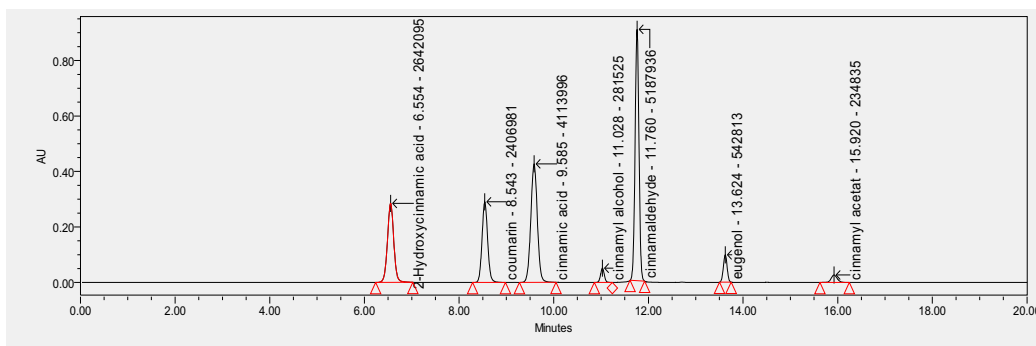
Bảng 1. Bước sóng hấp thụ cực đại của các chất phân tích

Tên hoạt chất	Acid 2-hydroxycinnamic	Coumarin	Acid cinnamic	Cinnamyl alcohol	Cinnamaldehyd	Eugenol	Cinnamyl acetat
Bước sóng hấp thụ cực đại (nm)	272; 320	277	271	251	289	282	251

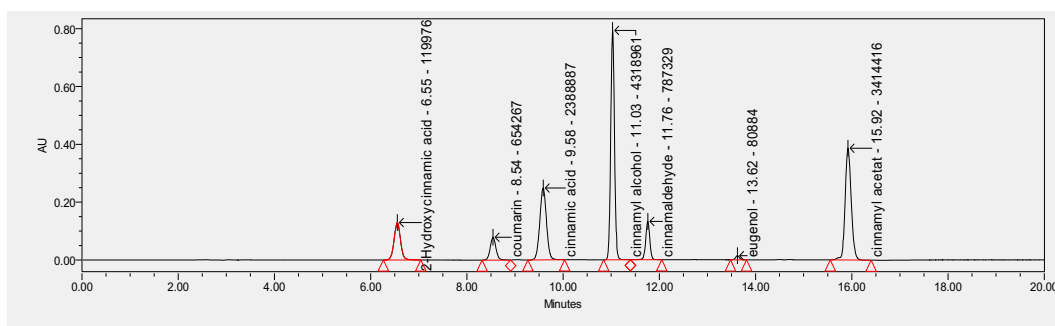
Để giảm ảnh hưởng của dung môi và tạp chất nhưng vẫn đảm bảo được độ nhạy của phương pháp khi phân tích 07 chất trên chọn bước sóng phát hiện tại 250 nm được lựa chọn để phân tích cinnamyl alcohol, cinnamyl acetat và 280 nm để phân tích acid 2-hydroxycinnamic, coumarin, acid trans-cinnamic, cinnamaldehyd, eugenol.

3.1.2. Khảo sát chương trình dung môi HPLC

Qua quá trình khảo sát chúng tôi đưa ra điều kiện phân tích trên thiết bị HPLC như sau: pha động kênh A: amoni acetat 30 mM, kênh B: CH₃CN : CH₃OH (50 : 50, 40 : 50), chương trình dung môi với tốc độ dòng 1,0 mL/phút, kênh B tăng từ 40 - 50% trong 5 phút, giữ 50% kênh B trong 2 phút, tăng lên 65% kênh B trong 3 phút, tăng tiếp lên 70% kênh B trong 3 phút và trở lại 40% kênh B trong 1 phút. Sắc ký đồ 07 chất chuẩn phân tích theo chương trình dung môi được thể hiện trong hình 1 và hình 2.



Hình 1. Sắc ký đồ 07 chất phân tích tại bước sóng 280 nm



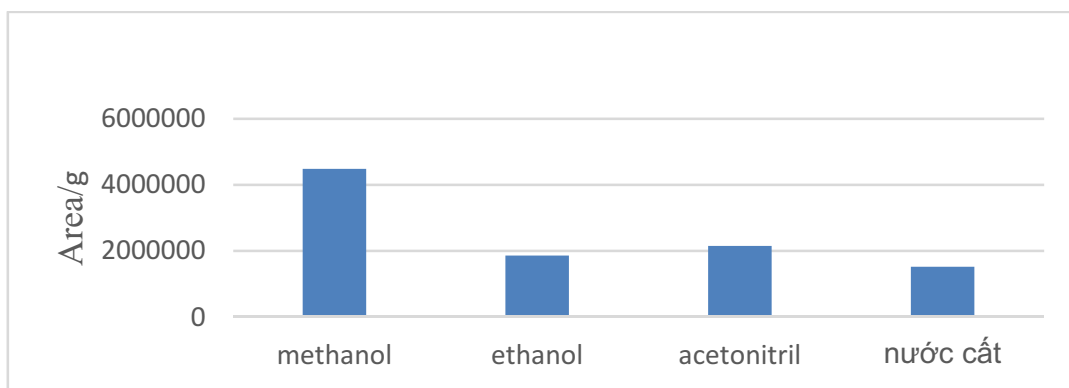
Hình 2. Sắc ký đồ 07 chất phân tích tại bước sóng 250 nm

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Các chất trong quế có khả năng tan được trong dung môi hữu cơ. Vì vậy, nhóm nghiên

cứu tiến hành khảo sát các loại dung môi chiết khác nhau (CH_3CN , CH_3OH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, H_2O) đối với nền mẫu thực. Kết quả khảo sát thể hiện trong hình 3.

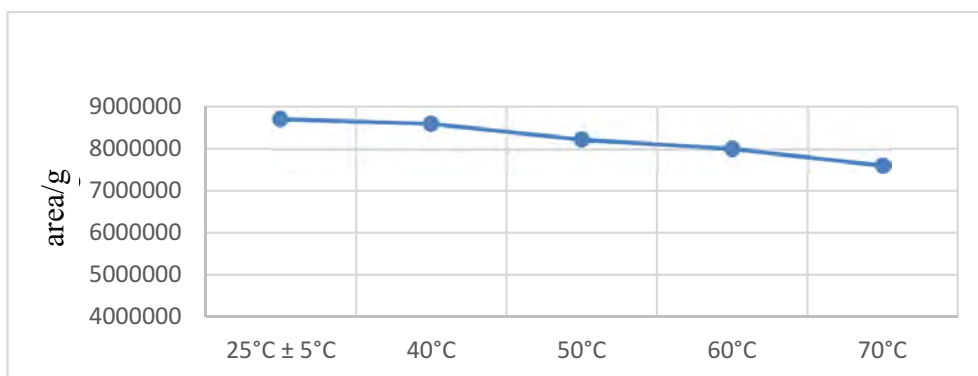


Hình 3. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Như vậy theo kết quả thu được thì khi sử dụng CH_3OH cho hàm lượng các chất chiết được là lớn nhất. Do đó, dung môi chiết được chọn cho các khảo sát là CH_3OH trong các khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát nhiệt độ chiết mẫu

Nhiệt độ được sử dụng với mục đích làm tăng khả năng hòa tan các chất vào trong dung môi chiết. Khảo sát nhiệt độ chiết mẫu theo quy trình dự kiến với dung môi chiết mẫu là CH_3OH tại nhiệt độ: 25°C , 40°C , 50°C , 60°C , 70°C đối với nền mẫu thực. Kết quả khảo sát thể hiện trong hình 4.

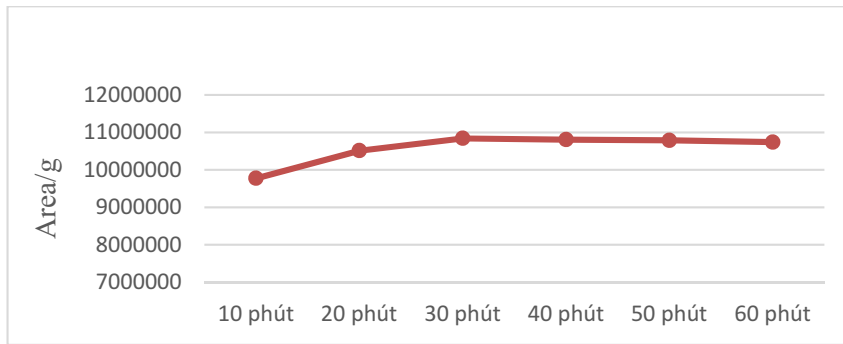


Hình 4. Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết mẫu

Với tính chất là nhóm tinh dầu bay hơi, do đó khi nhiệt độ càng cao khả năng bay hơi của tinh dầu càng tốt. Như vậy theo kết quả thu được thì từ nhiệt độ 40°C trở xuống cho tín hiệu các chất là lớn nhất đối với dung môi CH_3OH . Do đó, điều kiện nhiệt độ phòng ($25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$) được lựa chọn trong các khảo sát tiếp theo.

3.2.3. Khảo sát thời gian chiết mẫu

Thời gian chiết ảnh hưởng đến tổng thời gian phân tích, do đó thời gian phân tích phải phù hợp đủ để chiết hết các chất có trong mẫu. Khảo sát thời gian chiết mẫu theo quy trình dự kiến là 10 phút, 20 phút, 30 phút, 40 phút, 50 phút, 60 phút đối với nền mẫu thực. Kết quả khảo sát thể hiện trong hình 5.



Hình 5. Kết quả khảo sát thời gian chiết mẫu

Như vậy theo kết quả thu được, thời gian chiết mẫu lớn hơn 30 phút cho kết quả hàm lượng các chất chiết không có sự thay đổi. Do đó để tiết kiệm thời gian, thời gian chiết mẫu là 30 phút được lựa chọn.

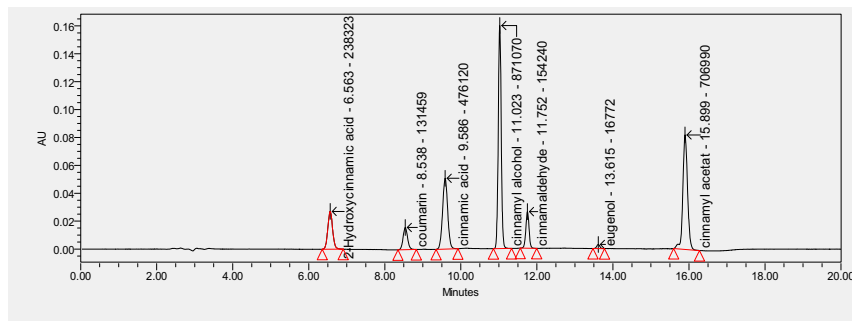
Dựa vào kết quả khảo sát, quy trình xử lý mẫu tối ưu như sau: Cân 0,5 - 1,5 g đối với nền mẫu quế và 1 - 3 g đối với nền mẫu thực phẩm chứa quế vào ống ly tâm 50 mL, thêm 30 mL CH₃OH, lắc đồng nhất bằng máy lắc ngang trong 30 phút và ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút, trong 5 phút. Chuyển bình định mức 50 mL. Định mức đến vạch bằng CH₃OH. Lọc qua màng lọc 0,2 μm (pha loãng nếu cần), chuyển sang lọ 2 mL và phân tích trên HPLC.

3.3. Thảm định phương pháp

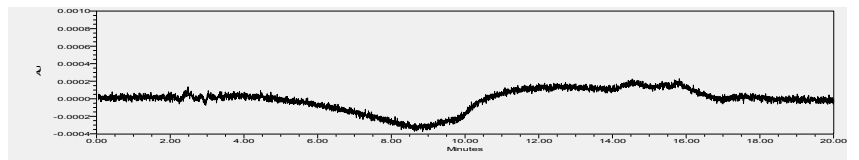
3.3.1. Độ đặc hiệu

Phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn: Từ sắc đồ tại hình 6, hình 7, hình 8 cho thấy mẫu trắng (dung môi chiết) không có tín hiệu của chất phân tích, mẫu trắng thêm chuẩn có pic của các chất ở thời gian lưu tương tự với thời gian lưu của chuẩn tương ứng (chênh lệch thời gian lưu không quá 2%). Như vậy, phương pháp đảm bảo tính đặc hiệu để phân tích các chất có trong quế.

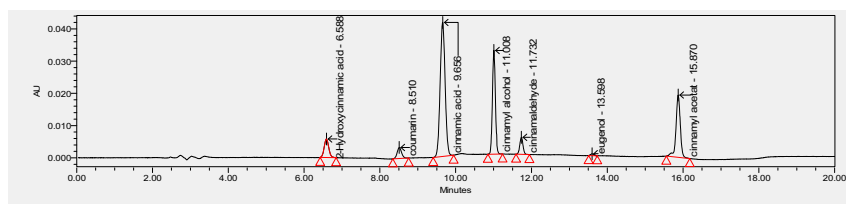
Hình 6. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp nồng độ 50 ppm



Hình 7. Sắc ký đồ của mẫu trắng



Hình 8. Sắc ký đồ của mẫu trắng thêm chuẩn nồng độ 50 ppm



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

Để đánh giá LOD, LOQ của phương pháp, chuẩn hỗn hợp 07 chất được sử dụng, sau đó tiến hành pha loãng mẫu bằng dung dịch mẫu thực không chứa chất phân tích (cân 5 g, xử lý theo quy trình đã thẩm định) và phân tích cho tới khi thu được chiều cao chất phân tích gấp 3 lần tín hiệu đường nền. Do đó xác định được LOD. Theo AOAC [1, 4, 5]: $LOQ = 3 \times LOD$. Kết quả phương pháp có LOD và LOQ của acid 2-hydroxycinnamic, coumarin, cinnamaldehyd, cinnamyl alcohol, eugenol là 1,0 µg/g và 3,3 µg/g; LOD và LOQ của acid cinnamic, cinnamyl acetat là 2,0 µg/g và 6,7 µg/g.

3.3.3. Đường chuẩn

Để xác định khoảng tuyến tính, thực hiện đo các dung dịch chuẩn có nồng độ thay đổi từ 0,1 - 100 mg/L đối với 07 chất và khảo sát sự phụ thuộc của tín hiệu vào nồng độ. Sau đó vẽ đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Phương trình đường chuẩn hồi quy tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ của 07 chất phân tích

Tên hoạt chất	Đường chuẩn
<i>Cinnamaldehyd</i>	$y = 51866x + 753,53, R^2 = 1$
<i>Cinnamyl alcohol</i>	$y = 43183x + 2092, R^2 = 1$
<i>Acid cinnamic</i>	$y = 41153x + 1849,6, R^2 = 1$
<i>Cinnamyl acetat</i>	$y = 34123x + 408,6, R^2 = 1$
<i>Acid 2-hydroxy cinnamic</i>	$y = 26434x + 1060,2, R^2 = 1$
<i>Coumarin</i>	$y = 24067x + 927,64, R^2 = 1$
<i>Eugenol</i>	$y = 5431,5x + 616,45, R^2 = 1$

Đường chuẩn có hệ số hồi quy tuyến tính $R^2 = 1$, các giá trị độ chệch so với điểm chuẩn ban đầu cũng đều nằm trong giới hạn $\pm 15\%$ theo yêu cầu của nhiều tổ chức tại Mỹ, Canada, Châu Âu. Như vậy, đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính diện tích pic của 07 chất từ 0,1 - 100 mg/L là đạt yêu cầu và được chấp nhận theo AOAC.

3.3.4. Độ lặp lại

Khảo sát trên 01 nền mẫu quế và 01 nền mẫu thực phẩm chứa quế có phát hiện chất phân tích, thực hiện phân tích mẫu 06 lần theo quy trình đã khảo sát (3.2) và bơm mẫu vào hệ thống HPLC ở các điều kiện đã chọn. Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD %). Kết quả thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Độ lặp lại 07 chất trên nền mẫu quế và thực phẩm chứa quế

Tên hoạt chất		2-Hydroxyacid cinnamic	Coumarin	Acid cinnamic	Cinnamyl alcohol	Cinnamaldehyd	Eugenol	Cinnamyl acetat
Quế	Hàm lượng (mg/g)	0,0069	2,34	0,771	0,3	15,1	< LOQ	0,157
	RSD (%)	2,2	1,9	2,2	1,7	1,6	< LOQ	2,5
Thực phẩm	Hàm lượng (mg/g)	< LOQ	0,125	0,025	0,023	0,0091	1,87	0,0195
	RSD (%)	< LOQ	1,6	3,6	2,1	3,7	1,4	2,5

Từ kết quả thu được và so sánh theo quy định của AOAC, các chất phân tích đều có độ lặp lại nằm trong giới hạn cho phép (theo AOAC [1, 4, 5] với nồng độ < 100 mg/L yêu cầu RSD < 5,3%, kết quả thu được từ 2,10 - 3,71%; hay với nồng độ < 1% yêu cầu RSD < 2,7%, kết quả thu được từ (1,41 - 2,50%). Như vậy phương pháp có độ lặp đạt yêu cầu của AOAC khi phân tích 07 chất trên trong nền mẫu quế và thực phẩm chức năng chứa quế.

3.3.5. Độ thu hồi

Độ thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn hỗn hợp vào nền mẫu quế và thực phẩm chứa quế với 03 mức hàm lượng thêm vào tại 50%, 100%, 200% lượng chất có trong mẫu, mỗi mức thực hiện (1,41 - 2,50%) 03 lần. Sau xử lý mẫu xác định tỷ lệ (%) thu hồi của chuẩn hỗn hợp và phân tích theo quy trình đã xây dựng. Độ thu hồi của phương pháp được thẩm định trên 1 nền mẫu quế, 1 nền mẫu thực phẩm chứa quế. Kết quả được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Độ thu hồi của 07 chất trên nền mẫu quế và thực phẩm chứa quế

Tên hoạt chất	2-Hydroxyacid cinnamic	Coumarin	Acid cinnamic	Cinnamyl alcohol	Cinnamaldehyd	Eugenol	Cinnamyl acetat
Quế	85,4 - 107	98,1 - 103	95,3 - 99,2	95,1 - 101	98,3 - 102	90,3 - 98,8	95,7 - 101
Thực phẩm chứa quế	88,7 - 104	97,7 - 105	92,0 - 102	93,8 - 101	92,9 - 107	97,4 - 104	90,8 - 106

Hiệu suất thu hồi của các chất đều nằm trong giới hạn cho phép của AOAC [1, 3, 4]. Như vậy phương pháp có độ thu hồi đạt yêu cầu của AOAC khi phân tích đồng thời 07 chất trong nền mẫu quế và thực phẩm chứa quế.

3.3.6. Ứng dụng phân tích 07 chất trong quế trên một số mẫu thu thập trên thị trường

Tiến hành nghiên cứu trên 30 mẫu quế, 20 mẫu thực phẩm chứa quế và 15 mẫu TPCN chứa thành phần quế trên thị trường theo phương pháp trên và thu được kết quả như ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả phân tích một số mẫu quế và thực phẩm chứa quế

(Đơn vị: mg/g)

Tên hoạt chất	Acid 2-hydroxy cinnamic	Coumarin	Acid cinnamic	Cinnamyl alcohol	Cinnamaldehyd	Eugenol	Cinnamyl acetat
Quế	0,008 - 0,023	0,086 - 5,17	0,056 - 17,8	0,004 - 0,62	3,91 - 22,4	0,012 - 0,34	0,002 - 0,061
Thực phẩm	-	0,006 - 0,246	0,01 - 0,038	0,004 - 0,024	0,016 - 1,09	0,031 - 0,196	0,005 - 0,088
Thực phẩm chức năng	-	0,008 - 0,283	0,012 - 0,042	0,004 - 0,035	0,232 - 5,55	0,043 - 8,80	0,013 - 0,18

“-”: Không phát hiện

Kết quả thu được, các mẫu có hàm lượng 07 chất thay đổi khác nhau, phụ thuộc vào loài quế sử dụng, đặc biệt với coumarin gần như đều có trong các mẫu (55/65 mẫu) với hàm lượng thay đổi (0,086 - 5,17 mg/g). Mặc dù quế có tác dụng tốt đến cơ thể (chủ yếu thông qua hoạt chất cinnamaldehyd, eugenol có hàm lượng cao trong quế) nhưng trong quế lại chứa thành phần

coumarin có thể gây độc cho gan, nên khi sử dụng quế trong thực phẩm vẫn sẽ có một lượng coumarin vẫn đưa vào cơ thể thông qua các sản phẩm tiêu thụ.

Khi đánh giá theo quy định về liều lượng hấp thụ hàng ngày (TDI) của coumarin là 0,1 mg/kg bw/ngày, vậy với kết quả thu được từ mẫu quế có hàm lượng coumarin dao động từ 0,086 - 5,17 mg/g, thì một người với cân nặng 60 kg không được ăn quá 1,16 g quế có hàm lượng coumarin 5,17 mg/g và không quá 69,8 g quế có hàm lượng coumarin 0,086 mg/g.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp HPLC-PDA đã được áp dụng để phân tích đồng thời với các điều kiện sau: sử dụng C18 sunfire (250 x 4,6 mm, 5 µm), sử dụng pha động amoni acetat 30 mM và hỗn hợp methanol - acetonitril (50 : 50); theo chương trình gradient. Phương pháp cho có độ phù hợp hệ thống, độ đặc hiệu tốt, đường chuẩn tuyến tính có nồng độ từ 0,1 - 200 µg/mL, độ đúng có tỷ lệ thu hồi trên 80% khi đánh giá ở mức nồng độ chuẩn thêm vào ≤ 10 µg/mL, độ lặp lại có RSD < 7,3% khi phân tích 06 lần độc lập trên nền mẫu. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của acid 2-hydroxycinnamic, coumarin, cinnamaldehyd, cinnamyl alcohol, eugenol lần lượt là 1 µg/g và 3,3 µg/g; LOD và LOQ của acid cinnamic, cinnamyl acetat lần lượt là 2,0 µg/g và 6,7 µg/g, đáp ứng yêu cầu của AOAC. Phương pháp đã được áp dụng để sơ bộ đánh giá hàm lượng các chất trong một số mẫu quế, thực phẩm và thực phẩm chức năng chứa quế, đáp ứng yêu cầu của AOAC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trần Cao Sơn, Phạm Xuân Đà, Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thành Trung, *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học & vi sinh vật*. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2010.
- [2] K. Abraham, F. Wöhrlin, O. Lindtner, G. Heinemeyer and A. Lampen, "Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data", *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 54, no. 2 pp. 228-239, 2010.
- [3] R. Ananthkrishnan, Preeti Chandra, Brijesh Kumar and K. B. Rameshkumar, "Quantification of coumarin and related phenolics in cinnamon samples from south India using UHPLC-ESI-QqQLIT-MS/MS method", *International Journal of Food Properties*, vol. 2, no. 1, pp. 50-57, 2018.
- [4] Association of Official Analytical Chemists, *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, 2002.
- [5] Association of Official Analytical Chemists, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, pp. Appendix F 2016.
- [6] J. Blahová and Z. Svobodová, "Assessment of coumarin levels in ground cinnamon available in the Czech retail market", *The Scientific World Journal*, vol. 2012.
- [7] J. N. Barboza, C. S. M. B. Filho, R. O. Silva, J. V. R. Medeiros and P. Sousa, "An Overview on the Anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, no.6, pp.1-9, 2018.
- [8] S. Lungarini, F. Aureli and E. Coni "Coumarin and cinnamaldehyd in cinnamon marketed in Italy: A natural chemical hazard?", *Food Additives & Contaminants: Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, vol. 25, no. 11, pp. 1297-1305, 2008.
- [9] P. V. Rao and S. H. Gan "Cinnamon: A multifaceted medicinal plant", *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, 2014.

- [10] Constanze Sproll, Winfried Ruge, Claudia Andlauer, Rolf Godelmann and Dirk W.Lachenmeier, “HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods”, *Food Chemistry*, vol. 109, no. 2, pp. 462-469, 2008.
- [11] V. J. Bansode, “A review on pharmacological activities of cinnamomum cassia blume”, *International Journal of Green Pharmacy*, vol. 6, no. 2, pp.102-108, 2012.
- [12] Y. H. Wang, B. Avula, N. P. D. Nanayakkara, J. Zhao and I. A. Khan, “Cassia Cinnamon as a Source of Coumarin in Cinnamon-Flavored Food and Food Supplements in the United States”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 6. no. 18, pp. 4470-4476, 2013.

Summary

IMULTANEOUS DETERMINATION OF COUMARIN, CINNAMYL ALCOHOL, CINNAMALDEHYD, ACID CINNAMIC, EUGENOL, CINNAMYL ACETAT, ACID 2-HYDROXYCINNAMIC IN CINNAMON USING HPLC

Le Viet Ngan^{1*}, Le Dinh Chi², Nguyen Thi Hong Anh¹, Nguyen Bich Ngoc¹
Nguyen Thi Phuong Lan³, Nguyen Thi Minh Loi⁴, Le Thi Hong Hao¹

¹National Institute for Food Control

²Hanoi University of Pharmacy

³Vietnam Food Administration

⁴Quang Binh University

The aim of the present study was the development and validation of a simple, precise and specific reversed phase HPLC method for the simultaneous determination of coumarin, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyd, acid cinnamic, eugenol, cinnamyl acetat, acid 2-hydroxycinnamic in cinnamon. The substances were extracted from the sample matrices with methanol, shaken at room temperature for 30 minutes and determined by HPLC-PDA on the following conditions: column C18 sunfire (250 × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase 30 mM ammonium acetate and methanol : acetonitrile (50 : 50) using gradient condition. The recoveries were in the range of 90%, the repeatability has RSD % was lower than 7.3%, the LODs and LOQs of 2-hydroxycinnamic acid, coumarin, cinnamaldehyd, cinnamyl alcohol, eugenol were 1.0 μg/g and 3.3 μg/g, respectively; the LODs and LOQs of cinnamic acid, cinnamyl acetate were 2.0 μg/g and 6.7 μg/g, respectively. The method has been applied to analyze the cinnamon and cinnamon - contained food samples.

Keywords: coumarin, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyd, acid cinnamic, eugenol, cinnamyl acetat, acid 2-hydroxycinnamic, HPLC, PDA, cinnamon.