

Research Article**Simultaneous quantitative analysis of some main components
in cinnamon leaves (*Cinnamomum cassia*) by HPLC-PDA****Bui Thi Lan Phuong, Le Bao Tram, Quach Huy Hoang,****Tran Van On, Nguyen Thi Kieu Anh****Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam**(Received: 30 Jun 2024; Revised: 18 Sep 2024; Accepted: 22 Sep 2024)***Abstract**

Cinnamon leaves, a part of the cinnamon tree, are used as raw materials to extract cinnamon essential oil and as a spice in food processing. *Trans*-cinnamaldehyde is the main ingredients that have biological effects and high concentration in cinnamon, cinnamic acid is often used as a marker in the quantification methods of cinnamon, coumarin is the ingredient that needs to be controlled due to risk of liver toxicity. So that, cinnamaldehyde (CAL), cinnamic acid (CA) and coumarin (CM) have been chosen to determine quality of cinnamon leaves. The analytes in the test sample were extracted with methanol:water ratio 9:1 by ultrasound twice 30 minutes and resting for 30 minutes between extractions. The ultrasonic extract was analyzed using an HPLC-PDA, C18 column (250×4.6 mm, 5 μm) at 25°C, mobile phase system consisting of acetonitrile and 0.05% phosphoric acid is eluted according to the program's gradient, detection wavelength 280 nm. The method was determined according to AOAC 2016 guidelines with appropriate specificity and linearity ranging from 51.90-691.31 μg/mL for coumarin, 1.00-20.10 μg/mL for cinnamic acid and 52.45-609.8 μg/mL for *trans*-cinnamaldehyde, good repeatability with RSD from 0.46% to 0.61%, accuracy of coumarin, cinnamic acid and cinnamaldehyde were 101.0%, 100.7% and 100.7% respectively, meets AOAC requirements at 3 concentration levels. The study applied quantitative research methods to quantify coumarin, cinnamic acid and *trans*-cinnamaldehyde on 17 *C. cassia* leaves samples collected in provinces in Vietnam. In result, analyte concentrations varied widely between samples, with coumarin ranging from 0.53-2.47%, cinnamic acid from 0.01-0.08%, and cinnamaldehyde from 0.95-2.56%.

Keywords: *Cinnamon leaves, cinnamaldehyde, coumarin, HPLC-PDA, simultaneous quantification.*

* Corresponding author: Nguyen Thi Kieu Anh (E-mail: anhntk@hup.edu.vn)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4378>

Định lượng đồng thời một số thành phần chính trong lá quế (*Cinnamomum cassia*) bằng HPLC-PDA

Bùi Thị Lan Phương, Lê Bảo Trâm, Quách Huy Hoàng,

Trần Văn Ôn, Nguyễn Thị Kiều Anh*

Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Lá quế, một bộ phận cây quế được dùng làm nguyên liệu sản xuất tinh dầu quế và dùng làm gia vị trong chế biến thực phẩm. Trong lá quế, *trans*-cinnamaldehyd, acid cinnamic là thành phần chính, thường được dùng làm chất đánh dấu trong phương pháp định lượng thành phần quế, ngoài ra trong lá quế có chứa coumarin được quan tâm vì lo ngại nguy cơ gây độc trên gan. Do đó, lựa chọn ba chất này để đánh giá chất lượng lá quế. Mẫu thử được chiết siêu bằng methanol:H₂O tỷ lệ 9:1, dịch chiết được phân tích bằng HPLC-PDA với cột C18 (250×4,6 mm, 5 μm), chương trình gradient pha động gồm acetonitrile và acid phosphoric 0,05%, bước sóng phát hiện 280 nm. Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC 2016, kết quả độ đặc hiệu phù hợp, khoảng tuyến tính từ 51,90–691,3 μg/mL với coumarin, 1,00-20,10 μg/mL với acid cinnamic và 52,45-609,8 μg/mL với *trans*-cinnamaldehyd, độ lặp lại tốt với RSD từ 0,46-0,61% độ đúng của coumarin, acid cinnamic và cinnamaldehyd lần lượt là 101,0%, 100,7% và 100,7%, đạt yêu cầu của AOAC. Nghiên cứu đã định lượng được coumarin, acid cinnamic, *trans*-cinnamaldehyd trong 17 mẫu lá quế *C. cassia* thu hái tại các tỉnh ở Việt Nam. Kết quả hàm lượng coumarin từ 0,53-2,47%, acid cinnamic từ 0,01-0,08% và *trans*-cinnamaldehyd từ 0,95-2,56%.

Từ khóa: Lá quế, cinnamaldehyde, coumarin, HPLC-PDA, định lượng đồng thời.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quế (*Cinnamomum* spp.) từ lâu đã được sử dụng rộng rãi trong cuộc sống. Quế Việt Nam chủ yếu là loài *Cinnamomum cassia* Presl. có thể có một số loài khác như *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Cinnomum loureirii* Nees., bộ phận thường dùng của quế gồm có vỏ quế thân (quế nhục), quế cành (quế chi), tinh dầu quế, lá quế [1, 2]. Tuy nhiên, lá quế và tinh dầu lá quế chưa có nhiều thông tin nghiên cứu. Lá quế chủ yếu được sử dụng làm nguyên liệu để chiết xuất tinh dầu quế. Đồng thời việc sử dụng lá quế trong chế biến thực phẩm và nấu ăn có thể mang lại những tác dụng có lợi cho sức khỏe của con người [3]. Những nghiên cứu gần đây về lá quế đang chú trọng đến hướng nghiên cứu chuyên sâu hơn về các thành phần hóa học với nhiều tác dụng triển vọng trong điều trị đái tháo đường type 2, parkinson, ức chế vi khuẩn *staptococcus*, chống oxy hóa ... [3, 4]. Trong lá quế *C. cassia* các thành phần chính gồm *trans*-cinnamaldehyde, acid cinnamic, 3-methoxy-1,2-propanediol, ethylacetat, coumarin ... [4, 5] Trong đó *trans*-cinnamaldehyd là thành phần có tác dụng sinh học quan trọng và chiếm lượng lớn nhất [3]. Acid cinnamic luôn có mặt trong các bộ phận của quế và là chất đánh dấu được sử dụng để đánh giá chất lượng quế trong các dược điển [6-10]. Bên

cạnh đó, coumarin trong quế là thành phần được quan tâm nhiều do lo ngại có thể ảnh hưởng tới chức năng gan [11]. Vì vậy, để đảm bảo việc sử dụng lá quế một cách an toàn hợp lý thì việc kiểm soát chất lượng lá quế thông qua đánh giá hàm lượng CAL, CA và CM được đặt ra ngày càng cấp thiết hơn.

Hiện nay, nhiều phương pháp được sử dụng để xác định các chất này trong quế chi, quế nhục, tinh dầu quế sử dụng các thiết bị HPLC, GC [6-10]. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu và chưa có được điển nào quy định phương pháp định lượng các thành phần này trong lá quế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng phương pháp định lượng đồng thời CAL, CA và CM trong lá quế để cung cấp một phương pháp xác định hàm lượng các chất này trong các mẫu lá quế đảm bảo giá trị sử dụng, từ đó có lựa chọn phù hợp trong sử dụng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng/ vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá quế được thu hái vào tháng ra hoa tại các địa phương: Hòa Bình (7 mẫu), Bắc Kạn (2 mẫu), Quảng Ninh (3 mẫu), Yên Bái (1 mẫu), Thanh Hóa (2 mẫu) và Thái Nguyên (2 mẫu), tất cả các mẫu đã được định danh tên khoa học *Cinnamomum cassia* (L.) Presl. bởi nhóm nghiên cứu PGS. TS. Trần Văn Ôn tại Bộ môn Thực vật, Khoa Dược liệu-Dược cổ truyền, Trường Đại học Dược Hà Nội. Mẫu sau khi thu hái được phơi khô tự nhiên đến độ ẩm không quá 14%. Bảo quản trong túi PE kín, ghi nhãn rõ ràng, bảo quản khô ráo, thoáng mát.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Chất chuẩn acid cinnamic ($C_9H_8O_2$) hàm lượng 99% (hãng Shanghai Xian Ding Biotec, CAS: 621829, HB517250, Lot IWFDXAW); *trans*-cinnamaldehyd (C_9H_8O) hàm lượng 98%, (Hãng Ark Pharm, CAS No: 14371-10-9, Lot No: BRL645); coumarin ($C_9H_6O_2$) 99,99% (K4MC6MLG-25G, CAS 91-64-5);

Dung môi: acetonitrile (HPLC-Merck, Đức), methanol (MeOH) (HPLC-Fisher, Mỹ), acid phosphoric (PA-Merck, Đức).

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu GLP gồm: hệ thống HPLC-DAD Shimadzu LC-40D XR (Nhật Bản) được trang bị hệ thống bơm cao áp 4 kênh dung môi và detector PDA, phần mềm Labsolution; cột sắc ký Inertsil ODS (250×4,6 mm; 5 μm) (GL Sciences, Nhật Bản); cân phân tích Mettler Toledo GF-244A, độ chính xác 0,1 mg; cân phân tích Mettler Toledo XPE105, độ chính xác 0,01 mg (Mettler Toledo, Thụy Sĩ) và các thiết bị, dụng cụ phân tích phụ trợ khác.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

Xử lý mẫu: Lấy khoảng 10 g dược liệu đã cắt nhỏ, nghiền mịn, rây qua rây số 250. Cân chính xác khoảng 0,50 g bột dược liệu, cho vào bình định mức 25 mL. Thêm khoảng 15 mL dung môi chiết, siêu âm, định mức thể tích bằng dung môi chiết. Dịch siêu âm được ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút, hút phần dịch trong lọc qua màng lọc 0,45 μm, tiêm sắc ký.

Khảo sát dung môi chiết là hỗn hợp MeOH : H₂O với các tỷ lệ MeOH giảm dần 100-90-70-50-30-10-0%. Các điều kiện siêu âm gồm: siêu âm 30 phút (ĐK 1), siêu âm 30 phút, nghỉ 30 phút, siêu âm 30 phút (ĐK 2), lắc bập bênh 2 giờ, siêu âm 30 phút (ĐK 3), thấm ướt, ngâm 8 giờ trong dung môi chiết siêu âm 30 phút (ĐK 4), sử dụng đá khô để tránh gia nhiệt trong quá trình siêu âm.

Dung dịch chuẩn gốc: Các dung dịch chuẩn gốc CM, CA có nồng độ chính xác khoảng 2 mg/mL, dung dịch gốc CAL có nồng độ chính xác khoảng 3 mg/mL được chuẩn bị trong methanol, bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, tránh ánh sáng.

Dung dịch chuẩn định lượng: Các dung dịch chuẩn hỗn hợp sử dụng trong quá trình khảo sát và thẩm định bằng cách pha loãng chính xác các dung dịch chuẩn gốc bằng dung môi pha mẫu cho tới khi thu được dung dịch có nồng độ thích hợp và sử dụng ngay sau khi pha.

Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký Inertsil ODS (250×4,6 mm; 5 μm). Nhiệt độ cột 25°C. Tốc độ dòng pha động 1,0 mL/phút, hệ pha động sử dụng gồm acid phosphoric 0,05% trong nước (kênh A) và acetonitrile (kênh B) và theo chương trình gradient: 0-15 phút 85-75% kênh A, 15-21 phút 75-62% kênh A, 21-30 phút 62-60% kênh A, 30-38 phút 60% kênh A, 38-39 phút 60-85% kênh A, phút duy trì đến 45 phút, thể tích tiêm mẫu 10 μL, bước sóng phát hiện 280 nm [12].

Phương pháp xử lý dữ liệu: Hàm lượng % của CM, CA, CAL trong lá quế tính theo được liệu khô kiệt. Độ ẩm trong mẫu thử được xác định bằng phương pháp cất với dung môi (Phụ lục 12.13-ĐĐVN V) [2].

2.4.2. Thẩm định phương pháp

Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC [13]. Đánh giá độ đặc hiệu của chất phân tích trên mẫu chuẩn, mẫu thử và dung môi pha mẫu. Để đánh giá độ thích hợp hệ thống tiến hành tiêm sắc ký lặp lại 6 lần mẫu chuẩn hỗn hợp. Khoảng tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic được xác định bằng việc phân tích dãy dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao, ghi lại tín hiệu. Độ lặp lại được đánh giá bằng việc phân tích 6 lần độc lập một mẫu thử, phân tích khác ngày, khác người phân tích lặp lại thêm 6 lần để đánh giá độ chính xác trung gian. Chỉ tiêu độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử ở 3 mức nồng độ cao-trung bình-thấp. Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp dựa vào tỷ lệ đáp ứng của chất phân tích với nhiễu nền (S/N). Pha loãng mẫu thử đã biết nồng độ đến S/N~3 để xác định LOD, LOQ=LOD×3,3.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

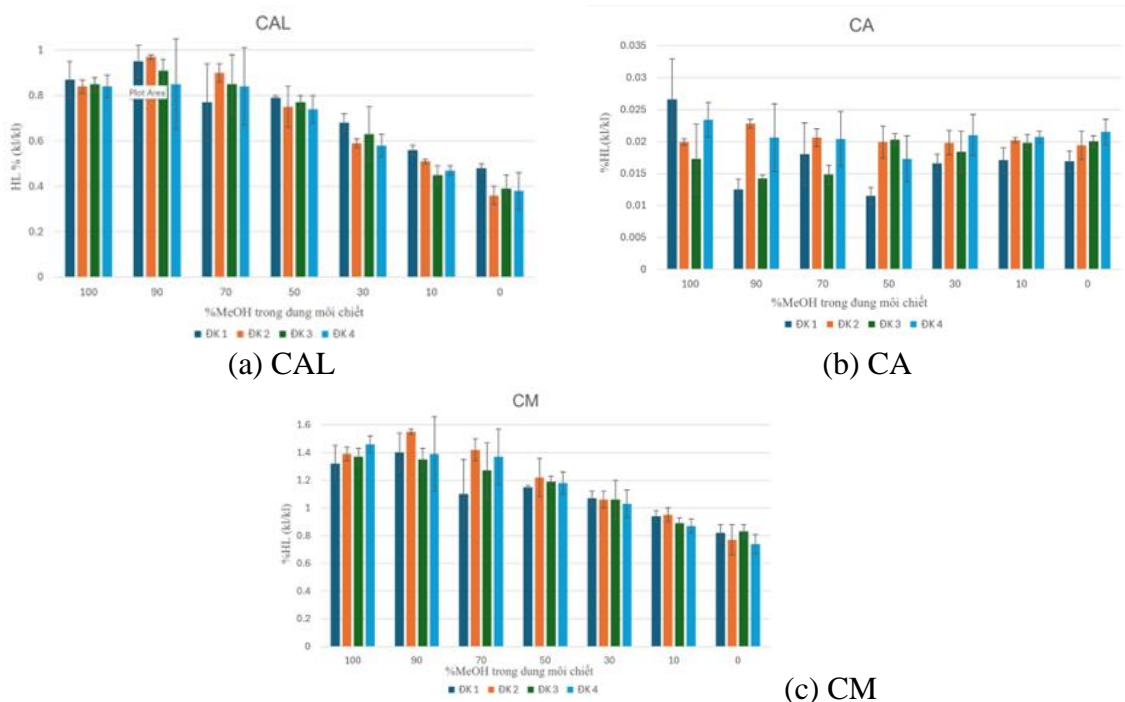
3.1. Phương pháp xử lý mẫu

Khảo sát dung môi chiết là hỗn hợp MeOH : H₂O với tỷ lệ MeOH giảm dần 100-90-70-50-30-10-0%, với các ĐK 1, ĐK 2, ĐK 3, ĐK 4. Kết quả hiệu suất chiết của CM, CA, CAL được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng chất phân tích khi chiết bằng các quy trình khác nhau với các tỷ lệ dung môi

Hàm lượng chất phân tích (% , tính theo được liệu khô kiệt) (n=3, TB±SD)												
%	ĐK 1			ĐK 2			ĐK 3			ĐK 4		
	CAL	CA	CM	CAL	CA	CM	CAL	CA	CM	CAL	CA	CM
MeOH	(×10 ⁻³)			(×10 ⁻³)			(×10 ⁻³)			(×10 ⁻³)		
100	0,87	26,6	1,32	0,84	19,9	1,39	0,85	17,3	1,37	0,84	23,4	1,46
	±0,08	±6,3	±0,13	±0,03	±0,5	±0,05	±0,03	±5,4	±0,06	±0,05	±2,7	±0,06
90	0,95	12,5	1,40	0,97	22,8	1,55	0,91	14,2	1,35	0,85	20,6	1,39
	±0,07	±1,6	±0,14	±0,01	±0,7	±0,02	±0,05	±0,5	±0,08	±0,20	±5,3	±0,27
70	0,77	18,0	1,10	0,90	20,6	1,42	0,85	14,8	1,27	0,84	20,4	1,37
	±0,17	±4,9	±0,25	±0,04	±1,4	±0,08	±0,13	±1,5	±0,20	±0,17	±4,3	±0,20
50	0,79	11,5	1,15	0,75	19,9	1,22	0,77	20,3	1,19	0,74	17,3	1,18
	±0,01	±1,3	±0,01	±0,09	±2,5	±0,14	±0,03	±0,9	±0,04	±0,06	±3,6	±0,08
30	0,68	16,6	1,07	0,59	19,8	1,06	0,63	18,4	1,06	0,58	21,0	1,03
	±0,04	±1,4	±0,05	±0,02	±1,9	±0,06	±0,12	±3,2	±0,14	±0,05	±3,2	±0,10
10	0,56	17,1	0,94	0,51	20,2	0,95	0,45	19,8	0,89	0,47	20,7	0,87
	±0,02	±1,9	±0,04	±0,01	±0,4	±0,05	±0,04	±1,3	±0,04	±0,02	±0,9	±0,05
0	0,48	16,9	0,82	0,36	19,4	0,77	0,39	20,0	0,83	0,38	21,5	0,74
	±0,02	±1,6	±0,06	±0,04	±2,2	±0,11	±0,06	±0,9	±0,05	±0,08	±2,0	±0,07

Đồ thị biểu diễn hàm lượng chất phân tích trong mẫu thử khi xử lý với các điều kiện khác nhau được đưa ra tại Hình 1.



Hình 1. Đồ thị biểu diễn hàm lượng chất phân tích trong mẫu thử khi xử lý với các điều kiện khác nhau (a) CAL, (b) CA, (c) CM

Từ kết quả Bảng 1 và Hình 1 cho thấy khi tăng tỷ lệ MeOH thì hiệu suất chiết tăng với CM và CAL đến 90%, ở tỷ lệ 100% lượng chất phân tích không tăng mà có chiều hướng giảm nhẹ, CA gần như không đổi. Khi sử dụng cùng tỷ lệ dung môi thì các quy trình khác nhau ảnh hưởng nhiều đến độ ổn định của kết quả, ĐK 2 cho kết quả có độ lệch chuẩn thấp nhất. Với cả 3 chất, sử dụng dung môi chiết có tỷ lệ MeOH 90% xử lý theo ĐK 2 thu được lượng chất phân tích lớn nhất và độ lệch chuẩn thấp nhất, do đó lựa chọn tỷ lệ và quy trình này để xử lý mẫu.

Xử lý mẫu là bước đầu tiên trong quá trình phân tích, ảnh hưởng lớn đến hiệu suất và độ chính xác của kết quả phân tích. Nghiên cứu xử lý mẫu bằng phương pháp chiết siêu âm đơn giản, có thể thực hiện được ở nhiều phòng thí nghiệm giúp cho việc xác định và định lượng các chất trên sắc ký đồ dễ dàng. Từ kết quả thực nghiệm thu được cho thấy, thời gian siêu âm tăng lên làm tăng hiệu suất và mẫu có độ lặp lại tốt hơn, so với chiết 1 lần hoặc ngâm chiết bằng lắc bập bênh 2 giờ hoặc thấm ướt ngâm 8 giờ. Tuy nhiên, quá trình siêu âm có thể làm tăng nhiệt độ do đó trong quá trình siêu âm sử dụng thêm đá khô và ngắt thời gian siêu âm làm 2 lần để nước không bị nóng lên. Dung môi chiết ảnh hưởng đến hiệu suất chiết, nghiên cứu sử dụng MeOH một dung môi rất phổ biến bởi có khả năng hòa tan nhiều hoạt chất với độ phân cực khác nhau. MeOH cũng là dung môi dễ tìm kiếm, có thể thấy ở nhiều phòng thí nghiệm. Các bước ly tâm, lọc mẫu trong quy trình chiết nhằm loại bỏ các tạp chất không tan, tạp có kích thước phân tử lớn không được đưa vào hệ thống sắc ký lỏng.

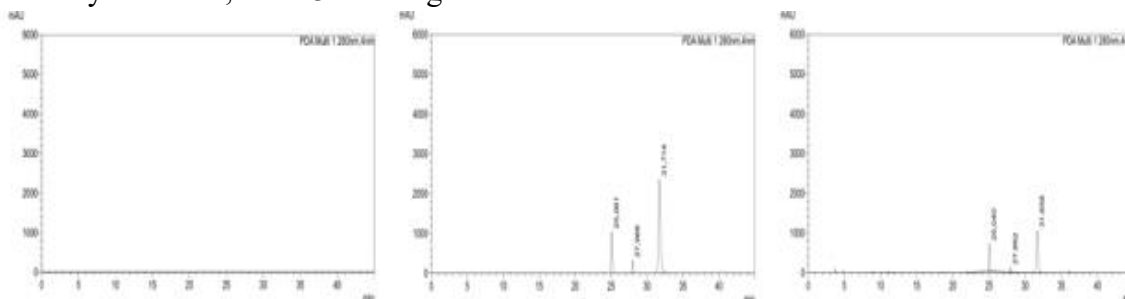
Quy trình chuẩn bị mẫu thử: Lấy khoảng 10 g lá quế đã cắt nhỏ, nghiền mịn, rây qua rây số 250. Cân chính xác khoảng 0,50 g bột lá quế vào bình định mức 25 mL, thêm khoảng 15 mL hỗn hợp MeOH:H₂O (9:1, v/v), siêu âm 30 phút, nghỉ 30 phút, siêu âm tiếp 30 phút, sử dụng đá khô trong thời gian siêu âm. Kết thúc quá trình siêu âm, đưa về nhiệt độ phòng, bổ sung hỗn hợp MeOH:H₂O (9:1,v/v) đủ thể tích, lắc đều. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút, hút phần dịch trong lọc qua màng lọc 0,45 µm, tiêm sắc ký.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích CM, CA và CAL trong mẫu lá quế ở Việt Nam được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC [13], kết quả thẩm định cụ thể:

* Độ chọn lọc

Chuẩn bị mẫu thử và mẫu hỗn hợp 3 chuẩn, tiến hành tiêm sắc ký. Kết quả thu được trình bày ở Hình 2, Hình 3 và Bảng 2.

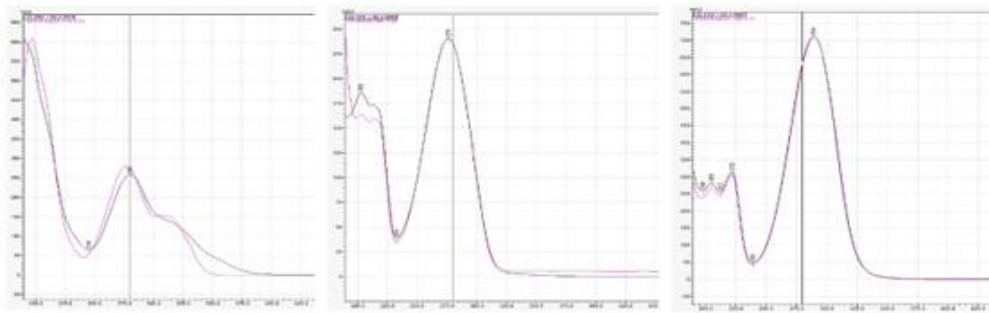


a, Dung môi pha mẫu

b, Mẫu chuẩn hỗn hợp

c, Mẫu thử

Hình 2. Sắc ký đồ của dung môi pha mẫu, mẫu chuẩn hỗn hợp (SST) và mẫu thử TVO 22-28



Hình 3. Phổ UV của các chất phân tích

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ đặc hiệu

Chất phân tích	Thời gian lưu t_R (phút)		Độ tinh khiết pic mẫu thử	Hệ số Match
	Mẫu thử	Mẫu chuẩn hỗn hợp		
Coumarin	25,04	25,08	0,9959	0,9925
Acid cinnamic	27,96	27,99	0,9997	0,9944
Cinnamaldehyd	31,66	31,71	0,9991	0,9936

Thời gian lưu của pic CM, CA và CAL trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn hỗn hợp và thời gian lưu của dung dịch mẫu thử tương đương nhau. Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic CM, CA và CAL (Hình 2, Hình 3). Độ tinh khiết pic CM, CA và CAL trong mẫu thử đều lớn hơn 0,995, phổ UV của các chất phân tích trong mẫu thử và mẫu chuẩn tương tự nhau với hệ số match đều lớn hơn 0,990 (Bảng 2).

** Độ thích hợp hệ thống*

Tiến hành tiêm sắc ký 6 lần lặp lại mẫu 3 chuẩn hỗn hợp có nồng độ lần lượt là CM 210,90 $\mu\text{g/mL}$, CA 7,52 $\mu\text{g/mL}$ và CAL 306,40 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả trình bày ở Bảng 3 cho thấy: RSD thời gian lưu của CM, CA và CAL trong 6 lần tiêm lặp lại lần lượt là 0,11%, 0,02% và 0,25% < 1,0%. RSD diện tích pic CM, CA và CAL trong 6 lần tiêm lặp lại lần lượt là 0,54%; 0,28% và 0,47% < 2,0%, hệ số kéo đuôi (Tailing Factor-TF.) đều nhỏ hơn 1,2.

Bảng 3. Kết quả thẩm định chỉ tiêu độ thích hợp hệ thống

Mẫu	CM (210,90 $\mu\text{g/mL}$)			CA (7,52 $\mu\text{g/mL}$)			CAL (306,40 $\mu\text{g/mL}$)		
	T_R (phút)	Diện tích (mAu)	TF.	T_R (phút)	Diện tích (mAu)	TF.	T_R (phút)	Diện tích (mAu)	TF.
SST1	25,081	13924856	1,10	27,988	3867386	1,16	31,714	43234832	1,16
SST2	25,080	13923257	1,10	27,992	3867762	1,16	31,711	43201424	1,16
SST3	25,082	13928774	1,10	27,991	3873116	1,16	31,710	43242744	1,16
SST4	25,083	13924978	1,10	27,994	3871429	1,16	31,712	43104233	1,16
SST5	25,078	13926838	1,10	27,988	3872390	1,16	31,706	43103171	1,16
SST6	25,078	13929254	1,10	27,988	3870412	1,16	31,706	43102589	1,16
TB	25,080	13926326,2		27,990	3870415,8		31,710	43164832,2	
RSD (%)	0,01	0,02		0,01	0,06		0,01	0,16	

* *Khoảng tuyến tính*

Để xác định khoảng tuyến tính, nghiên cứu tiến hành phân tích khảo sát 17 mẫu lá. Kết quả phân tích thu được khoảng nồng các chất phân tích lần lượt là: CM 94,48-676,3 $\mu\text{g/mL}$; CA 2,05-10,00 $\mu\text{g/mL}$; CAL 172,1-506,9 $\mu\text{g/mL}$. Do đó, chuẩn bị và phân tích dãy dung dịch chuẩn CM, CA, CAL với các khoảng nồng độ lần lượt là 51,9-691,3 $\mu\text{g/mL}$, 1,00-20,10 $\mu\text{g/mL}$ và 152,45-609,8 $\mu\text{g/mL}$, ghi lại tín hiệu để xác định khoảng tuyến tính của nồng độ và diện tích pic. Đường chuẩn được đánh giá thông qua hệ số tương quan tuyến tính r . Kết quả thẩm định được trình bày ở Bảng 4.

Trong khoảng nồng độ khảo sát của cả 3 chất CM, CA, CAL có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ các chất với hệ số tương quan tuyến tính r đều lớn hơn 0,999 (Bảng 4), cho thấy đường chuẩn được xây dựng có độ tuyến tính cao, đảm bảo phép phân tích định lượng CM, CA, CAL. Độ chệch tại mỗi nồng độ trên đường chuẩn đều $<5\%$.

Sử dụng phần mềm Excel để phân tích phương sai của phương trình đường chuẩn xây dựng được, giá trị P_{value} đều lớn hơn 0,05 chứng tỏ giá trị hệ số chẵn khác 0 không có ý nghĩa thống kê, do đó phương trình đường chuẩn của CM, CA, CAL xây dựng được không mắc sai số hệ thống.

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

Pha loãng dung dịch mẫu thử thành các dung dịch có nồng độ giảm dần. Tiến hành sắc ký, nồng độ tại đó cho tỷ số tín hiệu/nhiều (S/N) ~ 3 thu được giới hạn phát hiện (LOD) của mẫu tiêm sắc ký. Phân tích lặp lại 4 lần. $LOQ=3,3 \times LOD$. Kết quả trình bày ở Bảng 4.

* *Độ lặp lại và độ chính xác trung gian*

Tiến hành phân tích mẫu thử trong 2 ngày, mỗi ngày thực hiện 6 lần độc lập trên cùng một mẫu. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy giá trị RSD của CM, CA và CAL của mỗi ngày và của cả hai ngày đều nằm trong giới hạn cho phép. Kết quả so sánh hàm lượng chất phân tích trong 2 ngày khác nhau, cả 3 chất đều có $F_{\text{TN}} < F_{\text{LT}}$ cho thấy kết quả phân tích 2 ngày với 2 người phân tích khác nhau có độ lặp lại giống nhau.

Bảng 4. Kết quả thẩm định chỉ tiêu khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện và độ lặp lại

	Coumarin	Acid cinnamic	Cinnamaldehyd
Khoảng tuyến tính			
Khoảng nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	51,90-691,3	1,00-20,10	152,45-609,8
Phương trình hồi quy	$y=46294x-43999$	$y=111946x-9139,4$	$y=99206x+135273$
Hệ số tương quan (r)	0,9999	1,0000	0,9999
P_{value}	0,739	0,120	0,565
% Y	0,5	0,8	0,4

	Coumarin	Acid cinnamic	Cinnamaldehyd
Giới hạn phát hiện (LOD)			
HL trong dược liệu (% , kl/kl)	$14,69 \times 10^{-4}$	$1,75 \times 10^{-4}$	$9,04 \times 10^{-4}$
Nồng độ tiêm sắc ký ($\mu\text{g/mL}$)	0,026	0,0031	0,016
Giới hạn định lượng (LOQ)			
HL trong dược liệu (% , kl/kl)	$48,4 \times 10^{-4}$	$5,78 \times 10^{-4}$	$29,82 \times 10^{-4}$
Nồng độ tiêm sắc ký ($\mu\text{g/mL}$)	0,086	0,010	0,053
Độ lặp lại (n=6, ngày 1, người phân tích 1)			
Hàm lượng trung bình (HLTB) (% , kl/kl)	0,85	0,031	1,42
RSD (%)	0,42	0,39	0,55
Độ chính xác trung gian (ngày 1, người phân tích 1 n=6; ngày 2 người phân tích 2 n=6)			
KNV 2, n=6			
HLTB (% , kl/kl)	0,85	0,031	1,41
RSD (%)	0,61	0,49	0,55
2KNV n=12			
HLTB (% , kl/kl)	0,85	0,031	1,41
RSD (%)	0,50	0,46	0,53
F-test ($F_{It}=5,05$)	2,07	1,61	1,00
Yêu cầu RSD [13]	1,9%	2,7%	1,9%

* *Độ đúng*

Dựa vào dữ liệu khảo sát sơ bộ hàm lượng 3 chất nghiên cứu trong mẫu thử, mức nồng độ trung bình của CM là 204 $\mu\text{g/mL}$, CA 7,2 $\mu\text{g/mL}$, CAL 310 $\mu\text{g/mL}$. Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn, sử dụng nền mẫu là mẫu lá TVO 22-28 có độ ẩm 11,04%, hàm lượng CM: 0,809%, CA: 0,068%, CAL: 1,448%. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ CM: 3515,65 $\mu\text{g/mL}$, CA: 256,80 $\mu\text{g/mL}$ và CAL: 5016,03 $\mu\text{g/mL}$. Cân chính xác khoảng 0,15 g bột dược liệu vào bình định mức 25 mL. Tiến hành thêm chính xác 1,0-1,5-2,0 mL dung dịch chuẩn gốc vào mẫu thử thu được các mẫu thử thêm chuẩn ở 3 mức thấp-trung bình-cao của CM, CA, CAL. Kết quả thẩm định độ đúng của phương pháp (Bảng 5) cho thấy cả 3 chất đều có độ thu hồi và RSD trong giới hạn cho phép theo yêu cầu của AOAC [13].

Bảng 5. Kết quả thẩm định chỉ tiêu độ đúng

Mức nồng độ thêm chuẩn	m _{chuẩn} thêm vào (µg)	m _{thử} (g)	m _{định lượng} (µg)	m _{tìm lại} (µg)	% tìm lại	TB	RSD (%)
Coumarin (Yêu cầu theo AOAC [13]: độ thu hồi 98,0-102,0%, RSD≤1,9%)							
Thấp	3516	0,1500	4617	3537	100,6	100,6	0,17
	3516	0,1505	4613	3530	100,4		
	3516	0,1509	4628	3541	100,7		
Trung bình	5274	0,1519	6399	5305	100,6	100,8	0,26
	5274	0,1506	6415	5330	101,1		
	5274	0,1513	6396	5307	100,6		
Cao	7031	0,1505	8235	7152	101,7	101,6	0,07
	7031	0,1500	8225	7145	101,6		
	7031	0,1576	8277	7142	101,6		
Acid cinnamic (Yêu cầu theo AOAC [13]: độ thu hồi 97,0-103,0%, RSD≤2,7%)							
Thấp	257	0,1501	351	260	101,2	101,1	0,18
	257	0,1513	351	259	100,9		
	257	0,1505	351	260	101,2		
Trung bình	385	0,1504	480	389	101,0	100,2	1,23
	385	0,1506	480	388	100,8		
	385	0,1509	472	381	98,78		
Cao	514	0,1508	613	521	101,5	100,8	0,76
	514	0,1509	607	516	100,5		
	514	0,1502	606	515	100,3		
Cinnamaldehyd (Yêu cầu theo AOAC [13]: độ thu hồi 98,0-102,0%, RSD≤1,9%)							
Thấp	5016	0,1511	7034	5087	101,4	101,0	1,12
	5016	0,1503	7042	5105	101,8		
	5016	0,1514	6950	4999	99,66		
Trung bình	7524	0,1508	9486	7543	100,3	100,1	0,92
	7524	0,1503	9394	7458	99,11		
	7524	0,1508	9539	7595	101,0		
Cao	10032	0,1509	1193	9990	99,58	100,9	1,16
	10032	0,1512	12112	10163	101,3		
	10032	0,1507	12157	10214	101,8		

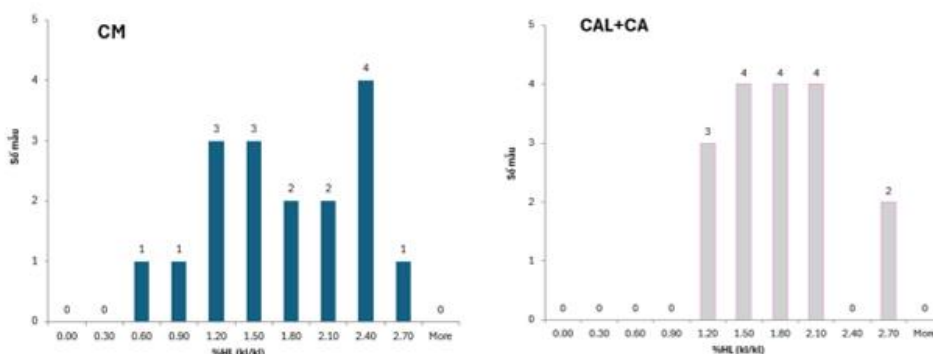
Từ các kết quả thu được cho thấy phương pháp đã xây dựng được thẩm định đạt yêu cầu các chỉ tiêu độ chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ đúng độ chính xác, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện theo hướng dẫn của AOAC, đảm bảo giá trị sử dụng trong thực tế.

3.3. Ứng dụng phương pháp phân tích

Áp dụng phương pháp đã thẩm định để phân tích 17 mẫu lá quế (n=2, lấy giá trị trung bình). Kết quả thể hiện ở Bảng 6 và Hình 4.

Bảng 6. Kết quả định lượng CM, CA và CAL của 17 mẫu lá quế

STT	Mẫu	Nguồn gốc	HLTB (%), kl/kl, tính theo được liệu khô kiệt)		
			CM	CA	CAL
1	TVO 22-08	Lào Cai	0,99	0,07	0,98
2	TVO 22-11	Yên Bái	1,19	0,04	1,49
3	TVO 22-13	Hoà Bình	2,47	0,06	2,56
4	TVO 22-14	Hoà Bình	2,35	0,08	1,84
5	TVO 22-15	Hoà Bình	1,49	0,04	1,14
6	TVO 22-17	Quảng Ninh	1,21	0,07	1,93
7	TVO 22-18	Quảng Ninh	0,53	0,05	1,40
8	TVO 22-19	Quảng Ninh	2,17	0,03	1,27
9	TVO 22-20	Thanh Hoá	1,40	0,07	0,95
10	TVO 22-21	Thanh Hoá	1,77	0,03	1,45
11	TVO 22-28	Thái Nguyên	0,84	0,03	1,18
12	TVO 22-29	Hoà Bình	1,56	0,03	1,49
13	TVO 22-31	Hoà Bình	1,93	0,02	1,75
14	TVO 23-35	Bắc Kạn	2,26	0,01	1,94
15	TVO 23-36	Bắc Kạn	2,30	0,02	1,78
16	TVO 23-43	Hoà Bình	1,99	0,03	2,56
17	TVO 23-44	Hoà Bình	0,91	0,03	1,64
Giá trị nhỏ nhất (%)			0,53	0,01	0,95
Giá trị lớn nhất (%)			2,47	0,08	2,56

**Hình 4.** Biểu đồ phân bố mẫu theo hàm lượng CM và CAL+CA

Từ Bảng 6 và Hình 4 cho thấy trong 17 mẫu lá quế, có 13 mẫu (chiếm 76,47% tổng số mẫu) có hàm lượng CM $\geq 1,0\%$ và chỉ 3 mẫu (chiếm 17,65% tổng số mẫu) có hàm lượng CAL+CA $\geq 2,0\%$. Tuy nhiên, khi phân tích mẫu vỏ quế của 17 cây này thì không có mẫu nào có hàm lượng CM vượt quá 1,0% và CAL nhỏ hơn 2,0% (mẫu có hàm lượng CM lớn nhất là 0,61%, mẫu có hàm lượng CAL nhỏ nhất là 2,34%) [11]. Kết quả này cho thấy, với cùng cây nhưng bộ phận dùng khác nhau thì hàm lượng các thành phần khác nhau, trong lá quế, hàm lượng CAL và CA thấp hơn so với trong mẫu vỏ nhưng CM lại cao hơn. Do đó, sử dụng lá quế làm nguyên liệu để sản xuất tinh dầu cần lưu ý đánh giá chất lượng để thu được tinh dầu có thành phần các chất theo mong muốn. Ngoài ra khi sử dụng lá quế khô để làm gia vị cần lưu ý đến lượng CM, nên lựa chọn những mẫu lá quế có hàm lượng CM thấp để đảm bảo an toàn khi sử dụng.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công phương pháp xử lý mẫu đơn giản, kỹ thuật phân tích HPLC phổ biến, phương pháp đã định lượng được đồng thời CM, CA và CAL trong lá quế. Phương pháp phân tích đã được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của AOAC [13], có độ đặc hiệu, độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính rộng. Phương pháp này phù hợp để đánh giá đồng thời hàm lượng CM, CA và CAL trong lá quế và đã được ứng dụng để phân tích 17 mẫu lá quế được thu hái tại địa phương có diện tích vùng trồng lớn ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Vo Van Chi, *Dictionary of Vietnamese medicinal plants*, Medical Publishing House, 2012 (in Vietnamese).
- [2]. Ministry of Health, *Vietnam Pharmacopoeia V*, 2017 (in Vietnamese).
- [3]. Anna Vallverdú-Queralt, Jorge Regueiro, Miriam Martínez-Huélamo, José Fernando Rinaldi Alvarenga, Leonel Neto Leal, and R. M. Lamuela-Raventos, "A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay," *Food Chemistry*, vol. 154, pp. 299-307, 2013.
- [4]. Putri Wulandari and Elsa Yuniarti, "Bioactivity Potential and Chemical Compounds of Cinnamomum: Literature Review," *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, vol. 9, no. 5, pp. 1-7, 2023.
- [5]. Rui Wang, Ruijiang Wang, and Bao Yang, "Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 10, pp. 289-292, 2009.
- [6]. The Korea Food and Drug Administration, *The Korea Pharmacopoeia 12th (KP12)*.
- [7]. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region of the People's Republic of China, *Hong Kong Chinese Materia Medica Standards*, 2009.
- [8]. Chinese Pharmacopoeia Commission, *Pharmacopoeia of the people's republic of china*, 2020.
- [9]. United State Pharmacopoeia, *USP*. 2022.
- [10]. European Pharmacopoeia, *EP 11*. 2023.
- [11]. Daniel Brancheau, Brijesh Patel, and Marcel Zughaib, "Do Cinnamon Supplements Cause Acute Hepatitis?," *American Journal Case Reports*, vol. 16, pp. 250-254, 2005.
- [12]. Bui Thi Lan Phuong *et al.*, "Simultaneous quantitative analysis of coumarin, cinnamic acid and cinnamaldehyde in cinnamon bark towards standardization of cinnamon medicinal herbs," *Journal of Medicinal Materials*, vol. 29, no. 4, pp. 222-228, 2024 (in Vietnamese).
- [13]. AOAC INTERNATIONAL, "Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F.," 2016.