

NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH CÁC AXÍT CHLOGENIC TRONG HẠT CÀ PHÊ XANH THU THEO THỜI GIAN CHÍN BẰNG THIẾT BỊ HPLC-QTOF

Đến tòa soạn 28-01-2024

Lê Ngọc Hùng^{1,2}, Đỗ Ngọc Thúy², Nguyễn Đức Anh^{2,*}, Phùng Văn Trung³

1. Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam

2. Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam

3. Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam

* Email: ngoc10hung@yahoo.com

SUMMARY

ANALYSIS OF CHLOROGENIC ACIDS IN THE GREEN COFFEE BEANS OF DIFFERENT COLLECTION TIMES BY HPLC-QTOF TECHNIQUES

Chlorogenic acids (CGAs) constitute a large family of esters and are present in many medicinal plants. CGAs play an important role in modern traditional medicine, but only some of this family's pure compounds have been thoroughly researched and shown good pharmaceutical effects. The green coffee beans (CFX) contained ~ 11% of CGAs depending on the species, cultivation and harvested conditions. The quantitative analysis could show the presence of separate CGA compounds. Instead of using expensive pure CGA compounds as analysis standard, the HRMS-QTOF detector could unequivocally assign the compound identity while the coupled HPLC could effectively separate the CGAs. In this study, the HPLC-QTOF technique was used to qualitatively determine the CGAs present in the green coffee beans. It showed that the CFX harvested in different times have the same CGAs profiling.

Keywords: Green coffee bean, harvest times, chlorogenic acids, qualitative, QTOF.

1. MỞ ĐẦU

Một nhóm hoạt chất quan trọng trong tự nhiên - các axit chlorogenic (CGAs) là các este tạo thành từ axit quinic acid và một hoặc nhiều axit caffeic, p-coumaric, ferulic [1]. Một nguồn CGAs quan trọng là chiết xuất từ hạt cà phê xanh (CFX) [2]. Các CGAs có trong hạt cà phê xanh thu hái ở thời điểm khác nhau chủ yếu gồm các đồng phân mono-Caffeoylquinic acid (mono-CQA: 3-/4-/5-CQA); mono-Feruloylquinic acid (mono-CFA: 3-/4-/5-

FQA); di-Caffeoyl quinic acid (di-CQA: 3,4/3,5/4,5-diCQA);

Caffeoylferuloylquinic acid (CFQA), Coumaroylquinic acid (CoQA) với hoạt tính kháng oxi hóa, kháng viêm, kháng ung thư, hạ huyết áp, giảm cân chưa được nghiên cứu nhiều [3]. Để nghiên cứu thành phần hóa học dược liệu và đánh giá chất lượng, độ ổn định của nguyên liệu cao chiết, sản phẩm chứa CGAs, thường chỉ xác định định tính sự có mặt của CGAs.

Nhiều nghiên cứu định tính CGAs bằng phổ UV và HPLC-DAD, tách chất sạch rồi xác định cấu trúc đã được sử dụng nhưng nhược điểm là thời gian lâu và hóa chất, chất chuẩn đắt [4, 5]. Một phương pháp định tính CGAs hiện đại nhưng nhanh, khắc phục các nhược điểm trên là kỹ thuật HPLC-HRMS [6]. Việt Nam đã có một số nghiên cứu tách và phân tích CGAs từ cà phê [7]. Hiện nay trong nước chưa có nghiên cứu định danh từng hợp chất trong nhóm CGAs có trong hạt CFX trồng trong nước được thu hoạch ở các thời điểm khác nhau. Sự thay đổi thành phần các hợp chất CGAs chiết từ hạt CFX thu hái ở thời điểm khác nhau có thể thay đổi tác dụng dược lý của cao chiết sử dụng trong hỗ trợ điều trị. Nghiên cứu này định tính các CGA từ hạt CFX thu hái ở các thời điểm khác nhau trong mùa thu hoạch bằng kỹ thuật HPLC-QTOF.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Quả cà phê xanh loài *Robusta* được thu từ khu trồng cà phê của HTX Công Bằng Thuận An, Đắk Nông vào tháng 9 (bắt đầu chín: CFX-9), tháng 12 (chín đỏ: CFX-12) và tháng 2 (kết thúc vụ: CFX-2). Methanol hypergrade LiChrosolv® (Supelco), CH₃CN và HCOOH hypergrade LiChrosolv® (Merk) dùng cho LC-MS.

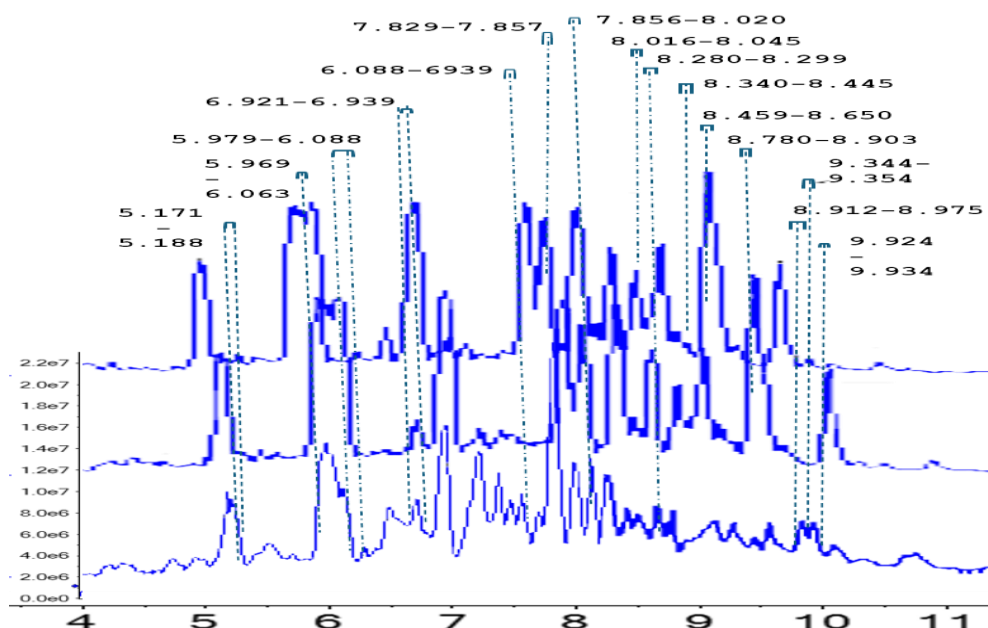
2.2. Nghiên cứu định tính CGAs

Phân tích định tính các axit chlorogenic bằng HPLC-QTOF, model ExionLCTM – X500_R QTOF (Sciex, Mỹ) theo phương pháp đã mô tả [9]. Cân 0,5g mẫu CFX;

nghiên mịn; chiết siêu âm trong methanol ở 40°C. Điều kiện tách tối ưu trên cột Thermo Scientific Hypersil GOLD, 150 x 2,1, 3μ; nhiệt độ cột 35°C; thể tích bơm mẫu 2 μl; tốc độ dòng: 0,45ml/phút; hệ dung môi gradient CH₃CN/ H₂O (bổ sung 0,1% axit formic) như sau 0-1,2 phút: 95% C, 1,2-15 phút: 95%-60%, 15-17 phút: 60%, 17-18 phút: 60-95%, 18-25 phút: 95%; tốc độ dòng 0,45 ml/phút. Định tính tối ưu với đầu dò khối phổ thời gian bay X500_R QTOF, Sciex các phổ khối ion mẹ âm và dương, ion mảnh ở chế độ ion hóa phun điện tử ESI; thế dòng ion -4.500 V; khí va chạm He với năng lượng va chạm -20 V; khoảng đo 100-2.000 Da, thời gian tích tín hiệu 0.25 giây; thế khử tích đám mây -80 V.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các sắc ký đồ phân tích thành phần hóa học ba mẫu CFX bằng kỹ thuật HPLC-QTOF thể hiện trong hình 1. Kết quả cho thấy trong cả ba mẫu, thành phần hóa học có sự khác nhau nhưng đều chia thành ba nhóm chất chủ yếu ở thời gian lưu 0.50-1.75 phút có cường độ trung bình, 4.50-10.50 phút có cường độ cao nhất và 13.00-21.00 có cường độ thấp. Ở mỗi đỉnh trong sắc ký đồ, lựa chọn nhóm số khối độ chính xác tới 4 chữ số sau dấu thập phân có cường độ cao nhất tương ứng ion mẹ, [M-H]⁻ và [M+H]⁺ để tạm thời gán tên hợp chất và các số khối còn lại (chỉ sử dụng m/z trước dấu thập phân) là của ion mảnh để định danh hợp chất dựa trên tài liệu tham khảo.



Hình 1. Nhóm thời gian lưu của mỗi đỉnh được định danh trong các sắc ký đồ mẫu CFX-12 (trên), CFX-9 (giữa), CFX-2 (dưới) phân tích bằng HPLC-QTOF

Bảng 1 tổng hợp các phổ khối ở mode đo âm (NEG) và dương (POS) bao gồm ion mẹ MS và ion mảnh MSⁿ của mỗi hợp chất được định danh trong mẫu CFX-9. Kết quả phân tích định danh cho thấy:

- Đỉnh ở thời gian lưu 5.183 phút có nhóm số khối độ chính xác tới 4 chữ số sau dấu thập phân có cường độ cao nhất với mảnh ion mẹ $m/z = 354.0805$, mảnh $[M-H]^-$ $m/z = 353.0759$ và $[M+H]^+$ $m/z = 355.0835$. Tra cứu và so sánh ngân hàng dữ liệu khối phổ bằng Sciex Cloud tool cho các hợp chất trong đó có các mono-CQA. Phân tích phổ khối các phân mảnh theo các tài liệu tham khảo đã nghiên cứu phân mảnh của các hợp chất mono-CQA cần định danh cho thấy phổ khối có phân mảnh $m/z = 191$ (phân mảnh MS/MS của ion mẹ mono-CQA) và mảnh $m/z = 179$ (phân mảnh MS/MS của CGA với cường độ 50% so với ion mẹ là đặc trưng của 3-CQA), các mảnh $m/z = 173$ cường độ trung bình (phân mảnh $m/z = 191$ mất một phân tử H₂O) và mảnh $m/z = 135$ cường

độ yếu (mảnh $m/z = 179$ mất một phân tử CO₂) đều là đặc trưng của 3-CQA [8]. Phổ khối này là đặc trưng của hợp chất 3-CQA.

- Phân tích phổ khối của hợp chất ở đỉnh sắc ký thời gian lưu 5.972 phút cho mảnh ion mẹ $m/z = 354.0803$, mảnh $[M-H]^-$ $m/z = 353.0759$ và $[M+H]^+$ $m/z = 355.0835$ là của nhiều hợp chất trong đó có các mono-CQA. Khối phổ ion mảnh gồm phân mảnh $m/z = 191$ cường độ cao nhưng không có mảnh $m/z = 179$ và $m/z = 173$ là đặc trưng của 5-CQA [8]. Phân tích tương tự phổ khối của hợp chất ở đỉnh sắc ký thời gian lưu 6.116 phút cho mảnh ion mẹ $m/z = 354.0807$ với có phân mảnh $m/z = 191$ cường độ yếu nhưng có ion mảnh $m/z = 173$ cường độ cao hơn nhiều là đặc trưng của 4-CQA.

- Phân tích phổ khối của hợp chất ở đỉnh sắc ký thời gian lưu 6.704 phút cho mảnh ion mẹ $m/z = 338.0873$ là của nhiều hợp chất trong đó có các CoQA. Khối phổ ion

mảnh gồm phân mảnh $m/z = 191$ cường độ cao, mảnh $m/z = 173$ và đặc biệt mảnh $m/z = 163$ là đặc trưng của *p*-coumaroylquinic acid [9].

- Phân tích phổ khối của hợp chất ở đỉnh sắc ký thời gian lưu 6.942 phút cho mảnh ion mẹ $m/z = 368.0953$ là của nhiều hợp chất trong đó có các FQA. Khối phổ ion mảnh gồm phân mảnh $m/z = 191$ cường độ cao, mảnh $m/z = 173$ và đặc biệt không có các mảnh $m/z = 179$ và $m/z = 161$ là đặc trưng của 5-O-feruloylquinic acid (5-FQA) [10].

- Phân tích phổ khối của hợp chất ở đỉnh sắc ký thời gian lưu 7.378 phút cho mảnh ion mẹ $m/z = 690.1573$ là của nhiều hợp chất trong đó có các di-CQFA. Khối phổ ion mảnh gồm phân mảnh $m/z = 678$; các mảnh $m/z = 529$ cường độ yếu và $m/z = 367$ cường độ rất yếu; mảnh $m/z = 353$ cường độ yếu; mảnh $m/z = 335$ cường độ rất yếu; mảnh $m/z = 173$ cường độ yếu là đặc trưng của 3,5- Dicafeoyl- 4- O- feruloylquinic acid [11].

- Phân tích ba phổ khối của các hợp chất ở các đỉnh sắc ký thời gian lưu 7.857 phút, 8.017 phút và 8.283 phút tương ứng cho các mảnh ion mẹ $m/z = 516.1060$, $m/z = 516.1172$ và $m/z = 516.1166$ là của nhiều hợp chất trong đó có các di-CQA.

+ Khối phổ ion mảnh ở thời gian lưu 7.857 phút cho mảnh $m/z = 353$ cường độ trung bình; mảnh $m/z = 335$ cường độ rất yếu; không có mảnh $m/z = 191$, $m/z = 179$ còn mảnh $m/z = 173$ cường độ rất yếu là đặc trưng của 3,4-di-O-cafeoylquinic acid.

+ Khối phổ ion mảnh ở thời gian lưu 8.019 phút cho phân mảnh $m/z = 353$ cường độ

tương đương ion mẹ; không có mảnh $m/z = 335$; có mảnh $m/z = 191$ cường độ yếu; mảnh $m/z = 179$ cường độ yếu hơn còn mảnh $m/z = 173$ cường độ rất yếu là đặc trưng của 3,5-di-O-cafeoylquinic acid.

+ Khối phổ ion mảnh ở thời gian lưu 8.283 phút cho phân mảnh $m/z = 353$ cường độ trung bình bằng 30% cường độ ion mẹ; mảnh $m/z = 335$, mảnh $m/z = 191$ cường độ rất yếu; mảnh $m/z = 173$ cường độ yếu là đặc trưng của 4,5-di-O-cafeoylquinic acid [8].

- Phân tích bốn phổ khối của các hợp chất ở các đỉnh sắc ký thời gian lưu 8.428 phút, 8.560 phút, 8.765 và 8.956 phút tương ứng các mảnh ion mẹ $m/z = 530.1223$, 530.1216, 530.1222 và 530.1221 là của nhiều hợp chất trong đó có các CFQA và FCQA.

+ Khối phổ ion mảnh ở thời gian lưu 8.428 phút cho mảnh $m/z = 499$, $m/z = 452$ và $m/z = 335$ cường độ trung bình; các mảnh $m/z = 191$, $m/z = 179$ và $m/z = 173$ cường độ yếu đặc trưng của 3-cafeoyl-4-feruloylquinic acid [12, 13].

+ Khối phổ ion mảnh ở thời gian lưu 8.560 phút cho phân mảnh $m/z = 367$ cường độ trung bình; không có mảnh $m/z = 335$ và $m/z = 191$; mảnh $m/z = 173$ cường độ yếu đặc trưng của 3-feruloyl-5-cafeoylquinic acid [12-14].

+ Khối phổ ion mảnh ở thời gian lưu 8.765 phút cho phân mảnh $m/z = 229$ cường độ trung bình còn các mảnh khác cường độ rất yếu trong đó $m/z = 173$ có cường độ yếu đặc trưng của 3-O-cafeoyl-4-O-feruloylquinic acid [12, 13].

+ Khối phổ ion mảnh ở thời gian lưu 8.956 phút cho phân cho phân mảnh $m/z = 367$ và $m/z = 353$ cường độ trung bình; không có mảnh $m/z = 335$ và $m/z = 191$; mảnh $m/z = 173$ cường độ yếu đặc trưng của 4-O-feruloyl-5-O-caffeoylquinic acid [12-14].

- Phân tích phổ khối của hợp chất ở đỉnh sắc ký thời gian lưu 9.947 phút cho mảnh ion mẹ $m/z = 350.1123$ là của nhiều hợp chất trong đó có các coumaroyl-

tryptophan. Khối phổ ion mảnh gồm phân mảnh $m/z = 229$ cường độ trung bình là đặc trưng của p-coumaroyl-N-tryptophan [13].

- Khi phân tích khối phổ phân giải cao ở mode đo dương POS, các mẫu đều có số khối $m/z = 195.1049$ của hoạt chất caffein ở thời gian lưu đặc trưng là 6.026 phút.

Chúng tôi không nghiên cứu định danh các hoạt chất có số khối khác ngoài các hoạt chất CGAs và caffein.

Bảng 1. Phân tích thành phần hóa học CGAs từ mẫu hạt cà phê xanh CFX-9

TT	RT (phút)	Phổ ion mẹ và mảnh ion	Hoạt chất
Mode đo NEG			
1	5.183		3-O-caffeoylquinic acid ($m/z = 354.0805$)
2	5.972		5-O-caffeoylquinic acid ($m/z = 354.0803$)
3	6.116		4-O-caffeoylquinic acid ($m/z = 354.0807$)
4	6.704		p-coumaroylquinic acid ($m/z = 338.0873$)
5	6.942		5-O-feruloylquinic acid ($m/z = 368.0953$)
6	7.378		3,5-O-dicaffeoyl-4-O-feruloylquinic acid ($m/z = 690.1537$)

7	7.857	Spectrum from CFX.wi2 (sample 1) - CFX-1 (-)ESI, Experiment 1, -IDA TOF MS (100 - 2000) from 7.857 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)	3,4-di-O-caffeoylquinic acid (m/z =516.1060)
8	8.017	Spectrum from CFX.wi2 (sample 1) - CFX-1 (-)ESI, Experiment 1, -IDA TOF MS (100 - 2000) from 8.017 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)	3,5-di-O-caffeoylquinic acid (m/z =516.1072)
9	8.283	Spectrum from CFX.wi2 (sample 1) - CFX-1 (-)ESI, Experiment 1, -IDA TOF MS (100 - 2000) from 8.283 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)	4,5-di-O-caffeoylquinic acid (m/z =516.1066)
10	8.428	Spectrum from CFX.wi2 (sample 1) - CFX-1 (-)ESI, Experiment 1, -IDA TOF MS (100 - 2000) from 8.428 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)	3-O-caffeoyl-4-O-feruloylquinic acid (m/z =530.1223)
11	8.560	Spectrum from CFX.wi2 (sample 1) - CFX-1 (-)ESI, Experiment 1, -IDA TOF MS (100 - 2000) from 8.560 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)	3-feruloyl-5-caffeoylquinic acid (m/z =530.1216)
12	8.765	Spectrum from CFX.wi2 (sample 1) - CFX-1 (-)ESI, Experiment 1, -IDA TOF MS (100 - 2000) from 8.765 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)	3-O-caffeoyl-4-O-feruloylquinic acid (m/z =530.1222)
13	8.956	Spectrum from CFX.wi2 (sample 1) - CFX-1 (-)ESI, Experiment 1, -IDA TOF MS (100 - 2000) from 8.956 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)	4-O-feruloyl-5-O-caffeoylquinic acid (m/z =530.1221)
14	9.947	Spectrum from CFX.wi2 (sample 1) - CFX-1 (-)ESI, Experiment 1, -IDA TOF MS (100 - 2000) from 9.947 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)	p-coumaroyl-N-tryptophan (m/z =350.1123)
		Mode đo POS	
15	6.026	Spectrum from CFX.wi2 (sample 4) - CFX-3 (-)ESI, Experiment 1, -IDA TOF MS (100 - 2000) from 6.026 min, noise filtered (noise multiplier = 1.5), Gaussian smoothed (0.5 points)	Caffeine (m/z =195.1049)

Phân tích định tính các CGAs trong các mẫu CFX-12 và CFX-2 bằng HPLC-

QTOF cho thời gian lưu mỗi hoạt chất trong sắc ký đồ ở hình 1 giao động trong

khoảng cho phép như mẫu CFX-9 và các hợp chất CGAs được định danh bởi số khối của ion mẹ và các mảnh ion đặc trưng có cùng nét đặc trưng.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu thành phần hóa học các CGAs của CFX chín ở thời điểm khác nhau từ khi bắt đầu chín vào tháng 9, chín đỏ vào tháng 12 và kết thúc vụ vào tháng 2 năm sau khẳng định sự có mặt của cùng các đồng phân mono-CGA (3-CQA, 5-CQA, 4-CQA); mono-CFA (5-FQA); di-CQA (3,5-diCQA; 3,4-diCQA; 4,5-diCQA); p-CoQA, di-CFA, p-coumaroyl-N-tryptophan. Kết quả khẳng định các mẫu hạt CFX thu hoạch ở thời điểm khác nhau trong cùng một vụ cà phê chín đều cùng có nét đặc trưng hợp chất CGAs như nhau. Ngoài ra các mẫu đều có caffein.

Lời cảm ơn: Các tác giả cảm ơn đề tài KHCN mã số 14/HĐ-SKHCN của UBND tỉnh Đắk Nông cung cấp kinh phí.

Cam kết: Tôi xin cam đoan đây là công trình của Lê Ngọc Hùng, Đỗ Ngọc Thúy, Nguyễn Đức Anh và Phùng Văn Trung chưa gửi đăng nội dung này ở bất kỳ tạp chí nào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Clifford MN (2000). Review: chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric* **80**:1033–1043
- [2] Dibert, K.L., Cros, E., & Andrieu, J. (1989). Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II. Kinetic data. *Journal of Food Engineering*, **10**, 199-214
- [3] Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, Fang X, Modarresi-Ghazani F, Wen Hua L (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother.* **Jan**; **97**:67-74
- [4] Ayelign, Abebe and Kebba Sabally (2013). Determination of chlorogenic acid content in beans and leaves of *Coffea arabica* using UV/Vis spectrometer. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* **13**(5):58-63
- [5] Cangeloni, L.; Bonechi, C.; Leone, G.; Consumi, M.; Andreassi, M.; Magnani, A.; Rossi, C.; Tamasi, G (2022). Characterization of Extracts of Coffee Leaves (*Coffea arabica* L.) by Spectroscopic and Chromatographic/ Spectrometric Techniques. *Foods*, **11**, 2495.
- [6] MN Clifford, J Kirkpatrick, N Kuhnert and PR Salgado (2008). LC-MSⁿ analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. *Food chemistry*, **Vol.106** (1), pp.379-385
- [7] Do Thi Thanh Huyen, Ngo Thi Phuong, Cao Son Tung, Le Ngoc Hung, Phuong Anh Tuan, Nguyen Tuan Anh, Le Minh Ha (2020). Chlorogenic acids from green coffee beans collected in Tay Nguyen provinces, *Vietnam Journal of Science and Technology*, **58** (6A), 10
- [8] Babova O, Occhipinti A, Maffei ME (2016). Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry.* **Mar**; **123**:33-9

- [9] Jaiswal R., Kuhnert N (2011). How to identify and discriminate between the methyl quinates of chlorogenic acids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*; **46**:269–281
- [10] Jaiswal R, Patras MA, Eravuchira PJ, Kuhnert N (2010). Profile and characterization of the chlorogenic acids in green *Robusta* coffee beans by LC-MS(n): identification of seven new classes of compounds. *J Agric Food Chem.*, **Aug 11**; **58(15)**:8722-37
- [11] Jaiswal R, Deshpande S, Kuhnert N (2011). Profiling the chlorogenic acids of *Rudbeckia hirta*, *Helianthus tuberosus*, *Carlina acaulis* and *Symphotrichum novae-angliae* leaves by LC-MS(n). *Phytochem Anal.*, **Sep-Oct**; **22(5)**:432-41
- [12] Masatsune Murata, Hiromi Okada, Seiichi Homma (1995). Hydroxycinnamic Acid Derivatives and p-Coumaroyl-(L)-tryptophan, A Novel Hydroxycinnamic Acid Derivative, from Coffee Beans, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **Volume 59, Issue 10, 1 January**, Pages 1887–1890
- [13] Iwahashi, H., Morishita, H., Osaka, N., & Kido, R. (1985). 3-O-feruloyl-4-O-caffeoylquinic acid from coffee beans. *Phytochemistry*, **24**, 630-632
- [14] Babova O, Occhipinti A, Maffei ME (2016). Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry*, **Mar**; **123**:33-9

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Đức Anh

Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội

Tel. +84-0387133361. Email: ngoc10hung@yahoo.com