

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG ACID TRANS-CINNAMIC TRONG VỎ QUẾ CHI BÀNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Khắc Tùng*, Nguyễn Thu Quỳnh
Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng để xác định hàm lượng acid trans-cinnamic trong vỏ quế chi thu hái ở Lạng Sơn bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. **Phương pháp nghiên cứu:** Vỏ quế chi sau khi sơ chế được chiết bằng kỹ thuật Soxhlet với dung môi methanol. Hàm lượng acid trans-cinnamic trong dịch chiết được định lượng bằng phương pháp HPLC với cột pha đảo (C8, 150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), pha động acetonitril/ dung dịch acid acetic 0,2%, (65: 35 v/v) tốc độ dòng là 1,0 ml/ phút, bước sóng phát hiện 280 nm. Phương pháp phân tích được thẩm định các chỉ tiêu: Độ phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng. **Kết quả:** Phương pháp HPLC với thông số đã lựa chọn pic acid trans-cinnamic có thời gian lưu khoảng 7,4 phút. Phương pháp phân tích có độ đặc hiệu cao, tính thích hợp của hệ thống với độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của thời gian lưu và diện tích pic trong các phép thử là 0,89% và 0,10%; độ đúng có tỷ lệ tìm lại khoảng 98,19% với độ lệch chuẩn tương đối RSD < 2%; độ lặp lại có RSD = 1,70%. Khoảng tuyến tính được xây dựng với nồng độ acid trans-cinnamic trong khoảng 0,1 mg/ml đến 1,0 mg/ml có hệ số tương quan $r \approx 1$. Phương pháp đã xây dựng phù hợp để xác định hàm lượng acid trans-cinnamic có trong dược liệu.

Từ khóa: Quế chi, tinh dầu quế, acid trans-cinnamic, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), thẩm định

Ngày nhận bài: 29/11/2018; Ngày hoàn thiện: 13/12/2018; Ngày duyệt đăng: 31/01/2019

STUDYING QUANTIFICATION OF TRANS CINNAMIC ACID IN CINNAMON TWIG BARK BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nguyen Khac Tung*, Nguyen Thu Quynh
University of Medicine and Pharmacy - TNU

ABSTRACT

Objectives: This study aims to develop and validate quantitative methods to appropriate the trans-cinnamic acid content in cinnamon bark collected in Lang Son by high performance liquid chromatography. **Method:** Cinnamon bark was extracted by soxhlet with methanol solution. The cinnamon bark extract was eluted by HPLC using a reverse-phase column (C8, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m) mobile phase containing acetonitrile / acetic acid solution 0.2%, (65: 35 v / v) at a flow rate of 1.0 ml/min, isocratic method and ultraviolet detection at 280 nm. The methods are validated indicators: system suitability, specificity, linearity, accuracy, detection limit, quantitation limit. **Results:** The HPLC method with selected parameters, pic of trans-cinnamic acid has retention time about 7.4 minutes. The methods have high specificity, suitability of the system with the relative standard deviation (RSD%) of the retention time and the area of the peak in the test was 0.89% and 0.10%; accuracy has a recovery rate of 98.19% with a standard deviation of RSD <2%; repetition rate with RSD = 1.60%. A linear response ($r \approx 1$) was observed in the range of 0,1 – 1,0 mg/ ml. The method was appropriately formulated to determine the trans-cinnamic acid in herbal medicine.

Key words: Cinnamom twig, cinnamon essential oil, trans-cinnamic acid, high performance liquid chromatography (hplc), validation.

Received: 29/11/2018; Revised: 13/12/2018; Approved: 31/01/2019

* Corresponding author: Tel: 0968 193986

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đồng phân trans của acid cinnamic là dạng thường dùng của acid cinnamic, có tự nhiên ở dạng tự do hoặc ester trong tinh dầu quế [3]. Acid trans-cinnamic đã được chứng minh có các tác dụng dược lý như: Chống nấm, kháng khuẩn [8], [9], có hiệu quả chống lại sự tổn thương da, hơn nữa còn có tính chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, và chống sốt rét [4], [7]. Y học cổ truyền xem quế là một trong bốn vị thuốc quý: “sâm, nhung, quế, phụ”. Hiện nay, ngoài sử dụng trực tiếp theo các bài thuốc cổ truyền, quế còn có trong rất nhiều sản phẩm thuốc từ dược liệu cũng như các sản phẩm là thực phẩm chức năng.

Việc xác định hàm lượng acid trans-cinnamic trong dược liệu cũng như các chế phẩm là rất cần thiết. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu định lượng hoạt chất này trong bột quế bằng HPLC [5], [6], tuy nhiên chưa thấy có nghiên cứu nào ở Việt Nam định lượng hoạt chất này có trong vỏ quế chi. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm giới thiệu thêm một phương pháp phân tích mới, chính xác, có độ tin cậy cao để xác định hàm lượng acid trans-cinnamic trong vỏ quế chi thu hái ở Lạng Sơn Việt Nam.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn và mẫu nghiên cứu

Thiết bị và dụng cụ:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi LaChrom Elite L-2400 UV Detectors.
- Cột sắc ký RESTEK C8 (150 mm × 4,6 mm; 5 µm).
- Cân phân tích Precisa XB 220A.
- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

Hóa chất, chất chuẩn:

- Methanol, acid acetic băng dùng cho HPLC.
- Chất chuẩn Acid trans-cinnamic, nguồn gốc: Trung Quốc, số đăng ký: 140-10-3, hàm lượng 99,5% (tính theo nguyên trạng).

Mẫu nghiên cứu: Vỏ cành của cây Quế (Cinnamomum cassia Presl) thu hái ở Lạng Sơn. Tiêu chuẩn lựa chọn: Cây quế có độ tuổi 8- 10 năm; chọn cành quế có đường kính 0,3- 1 cm. Các mẫu nghiên cứu được xác định tính đúng của dược liệu theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam IV- Chuyên luận Quế (Cành).

Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện sắc ký:

Sau quá trình khảo sát: Thành phần pha động, tỷ lệ dung môi hữu cơ, nhiệt độ cột, tốc độ dòng, chương trình sắc ký để định lượng acid trans-cinnamic trong vỏ quế chi được xây dựng như sau:

Pha động: Acetonitril – Dung dịch acid acetic 0,02% (65:35).

Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký pha đảo C8 (150 mm × 4,6 mm) được nhồi octylsilan (5 µm).

Detector quang phổ hấp thụ tử ngoại được đặt ở bước sóng 280 nm

Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Phương pháp xử lý mẫu:

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 25 mg acid trans-cinnamic chuẩn vào bình định mức dung tích 50 ml, thêm methanol vừa đủ 50 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch thử: Qua tham khảo tài liệu, chúng tôi lựa chọn quy trình chiết xuất acid trans-cinnamic phù hợp từ vỏ quế chi như sau: Vỏ quế chi được sấy ở 45°C đến độ ẩm nhỏ hơn 9%, nghiền thành bột thô. Cân chính xác khoảng 5,0 g bột, cho vào túi lọc, đặt vào thiết bị chiết Soxhlet; sử dụng dung môi chiết là methanol 99,5%, mỗi lần chiết với 150 ml trong thời gian 4 giờ. Chiết kiệt hoạt chất, gộp dịch chiết và bốc hơi dung môi thu lấy cặn. Hòa tan cặn trong 100 ml methanol, lắc siêu âm 15 phút, lọc qua màng lọc 0,45 µm được dung dịch (1) rồi tiến hành phân tích [5], [6].

Phương pháp định lượng:

- Xây dựng phương pháp định lượng bằng HPLC: Khảo sát pha động, tốc độ dòng, thể tích tiêm.

- Thẩm định phương pháp đã xây dựng: Về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, độ thu hồi và lặp lại, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, tính tuyến tính [1], [2].

Tiến hành định lượng:

Tiêm lần lượt các dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, tiến hành sắc ký và ghi lại sắc ký đồ. Dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử, hàm lượng acid trans-cinnamic trong dịch chiết quế.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Lựa chọn điều kiện sắc ký

Chọn bước sóng phát hiện: Để xác định bước sóng thích hợp phát hiện acid trans-cinnamic, chúng tôi tiến hành quét phổ UV của dung dịch acid trans-cinnamic 50 µg/ml trên máy quang phổ UV-Vis. Kết quả cực đại hấp thụ của dung dịch này là 280 nm.

Pha động:

- Dung môi:

+ Acetonitril – Dung dịch acid acetic 0,02% (60:40), pic của acid trans-cinnamic rửa giải chậm, thời gian lưu khoảng 13 phút.

+ Acetonitril – Dung dịch acid acetic 0,02% (65:35), thời gian lưu không quá dài, khoảng 7 phút, các pic cân đối, chân pic gọn.

+ Acetonitril – Dung dịch acid acetic 0,02% (70:30), sắc ký đồ xuất hiện pic bị kéo đuôi.

Như vậy, tỷ lệ pha động tốt nhất là Acetonitril – Dung dịch acid acetic 0,02% (65:35).

- Tốc độ dòng: Khảo sát lần lượt ở tốc độ 0,5 ml/phút; 1,0 ml/phút; 1,5 ml/phút thì thấy:

Với 1 ml/phút pic thu được cân đối, pic không bị kéo đuôi và áp suất cột không quá cao.

- Thể tích tiêm mẫu: Tiêm 20 µl cho kết quả phân tích có độ lặp lại cao hơn khi tiêm 15 µl.

Từ các khảo sát trên, chúng tôi xây dựng quy trình sắc ký có khả năng phân tích acid trans-cinnamic trong dịch chiết quế như sau: Cột sắc ký pha đảo C8 (150 mm × 4,6 mm) được

nhồi octylsilan (5 µm); pha động: Acetonitril – Dung dịch acid acetic 0,02% (65:35); detector quang phổ hấp thụ tử ngoại đặt ở bước sóng 280 nm; tốc độ dòng: 1 ml/phút; thể tích tiêm: 20 µl.

Với điều kiện sắc ký đã chọn, pic acid trans-cinnamic cân đối, thời gian lưu cho mỗi lần phân tích là phù hợp (khoảng 7 phút).

Kiểm tra lượng acid trans-cinnamic còn lại trong dược liệu sau các lần chiết

Sau khi chiết 3 lần, mỗi lần với 150 ml methanol. Thêm 100 ml methanol vào bình soxhlet. Chiết tiếp trong 4 giờ, thu lấy dịch chiết, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành sắc ký.

Kết quả: Trên hệ thống sắc ký đồ không xuất hiện pic của acid trans-cinnamic. Do đó chiết ba lần với methanol 100% đảm bảo chiết được hết acid trans-cinnamic trong mẫu cần nghiên cứu.

Thẩm định phương pháp

Độ thích hợp của hệ thống sắc ký:

Tiến hành khảo sát độ thích hợp của hệ thống sắc ký bằng cách tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn nồng độ 50 µg/ml. Kết quả khảo sát được trình bày ở Bảng 1.

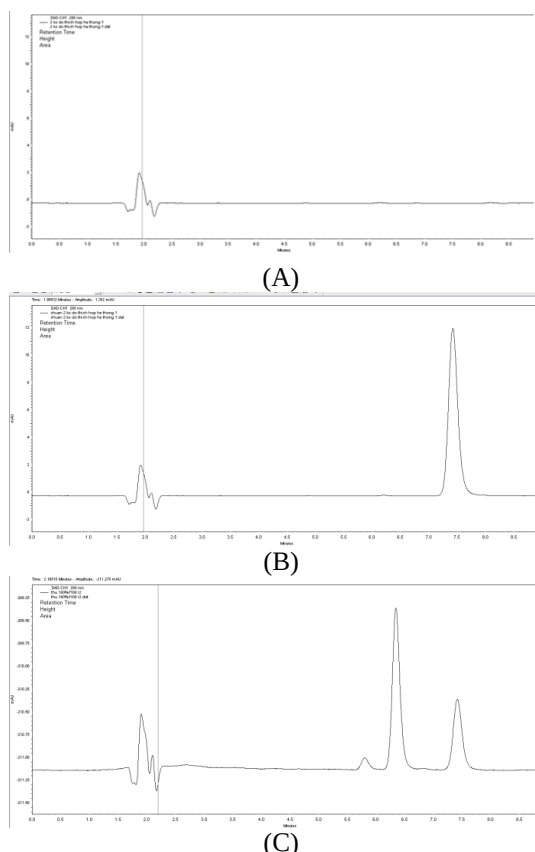
Bảng 1. Khảo sát độ thích hợp của hệ thống sắc ký

STT	Thông số	Kết quả
1	Thời gian lưu (t_R) (phút)	7,41
2	RSD của thời gian lưu (%)	0,89%
3	RSD của diện tích pic (%)	0,10%
4	RSD của chiều cao pic (%)	0,87%
5	Số đĩa lý thuyết	11498
6	Hệ số đối xứng	1,07

Nhận xét: Các kết quả thu được cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho phân tích định lượng acid trans-cinnamic trong dịch chiết quế.

Tính đặc hiệu - độ chọn lọc của phương pháp:

Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử theo các điều kiện HPLC đã lựa. Kết quả phải đạt chọn được như sau:



Hình 2. Sắc ký đồ thẩm định tính đặc hiệu của phương pháp
(a) mẫu trắng; (b) mẫu chuẩn; (c) mẫu thử

Bảng 2. Kết quả xác định khoảng tuyến tính

C (mg/ml)	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
Diện tích pic (mAU.s)					
1	1589,2	2174,8	3403,6	4735,2	5821,1
2	1594,1	2116,3	3335,1	4730,7	5924,3
Trung bình (mAU.s)	1591,65	2145,55	3369,35	4732,95	5872,7
Kết quả	Phương trình hồi quy: $y = 48,636x + 1013,4$ Hệ số tương quan tuyến tính $r = 0,9989$				

- Trên sắc đồ mẫu trắng không xuất hiện các pic có cùng thời gian lưu với pic của các chất phân tích trên sắc đồ mẫu chuẩn và mẫu thử.

- Trên sắc đồ mẫu thử có 1 pic có thời gian lưu tương tự như trên sắc đồ của dung dịch chuẩn.

Khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp:

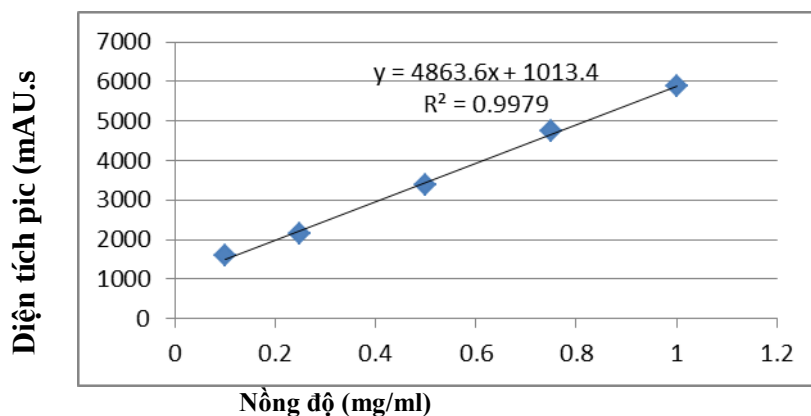
Pha một dãy dung dịch chuẩn acid trans-cinnamic có nồng độ từ 0,1 (mg/ml) đến 1,0 (mg/ml) và tiến hành sắc ký theo các điều kiện đã lựa chọn. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính được trình bày trong Bảng 2.

Phương trình hồi quy: $y = 48,636x + 1013,4$.
Hệ số tương quan $r = 0,9989$.

Nhận xét: Từ kết quả thu được cho thấy trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ chất định lượng và diện tích pic với hệ số tương quan $r = 0,9989$.

Khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành khảo sát độ lặp lại của phương pháp bằng cách thực hiện 6 thí nghiệm riêng biệt (mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần) để xác định hàm lượng acid trans-cinnamic có trong dung dịch thử.



Hình 3. Đồ thị khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp

Kết quả khảo sát được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

STT	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	4558,3	1,46
2	4632,1	1,49
3	4572,6	1,46
4	4524,8	1,44
5	4618,3	1,48
6	4683,0	1,51
Kết quả Giá trị trung bình 1,47 %; n=6; RSD= 1,70 %		

Nhật xét: Từ kết quả thu được cho thấy với chương trình sắc ký đã chọn, phương pháp định lượng có độ lặp lại tốt (độ lệch chuẩn tương đối 1,70 %)

Khảo sát độ đúng của phương pháp

Độ đúng của phương pháp được khảo sát bằng phương pháp thêm chuẩn. Thêm một lượng chính xác chất chuẩn khoảng 20% vào trong mẫu thử sao cho nồng độ của hoạt chất vẫn nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát và tiến hành định lượng theo phương pháp đã xây dựng. Cụ thể thêm chính xác khoảng 2 mg chất chuẩn acid trans-cinnamic vào 10 ml dung dịch thử (1), pha loãng 10 lần rồi tiến hành phân tích. Kết quả khảo sát được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	Lượng có sẵn (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	Tỷ lệ tìm lại (%)	Tính thống kê
1	7,3516	2,0013	9,3273	98,72	$\bar{X} = 98,11 \%$ RSD = 0,47 %
2	7,3516	2,0048	9,3061	97,49	
3	7,3516	2,0125	9,3306	98,34	
4	7,3516	1,9836	9,2936	97,90	
5	7,3516	2,0015	9,3155	98,12	

Nhận xét: Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phương pháp định lượng có độ đúng cao, phần trăm tìm lại = 98,11% và RSD= 0,47%.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Pha dung dịch chuẩn acid trans-cinnamic có nồng độ khoảng 50 µg/ml, sau đó giảm dần nồng độ bằng cách pha loãng gấp đôi và phân tích theo các điều kiện sắc ký đã chọn. Giới hạn phát hiện tìm được là 9,0 µg/ml, và giới hạn định lượng là 29,7 µg/ml.

KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

Các kết quả thực nghiệm cho thấy phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đã xây dựng để định lượng acid trans-cinnamic trong dược liệu vỏ quế chỉ có độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ tuyến tính, độ thu hồi tốt. Quy trình định lượng đơn giản, dễ thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm, dễ dàng triển khai áp dụng và tiết kiệm thời gian. Phương pháp này có

thể áp dụng để định lượng acid trans-cinnamic có trong các loại dược liệu khác nhau từ cây quế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Từ An (2010), *Kiểm nghiệm dược phẩm*, Nxb Y học, Hà Nội.
2. Đặng Văn Hòa, Vĩnh Định (2014), *Kiểm nghiệm thuốc*, Nxb Giáo dục Việt Nam.
3. Burdock G. A. (2016), *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*, CRC press, Boca raton, FL.
4. Couturier K., Qin B., Batandier C., Awada M., Hininger-Favier I., Canini F., Leverve X., Roussel A. M. and Anderson R. A. (2011), "Cinnamon Increase Liver Glycogen in an Animal Model of Insulin Resistance", *Metabolism*, 11, pp. 1590-1597.
5. Friederike Woehrlin, Hildburg Fry, Klaus Abraham, and Angelika Preiss-Weigert (2010), "Quantification of flavoring constituents in cinnamon: high variation of coumarin in cassia

- bark from the german retail market and in authentic samples from indonesia”, *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, pp. 10568–10575
6. Jaemin Lee, Dong Gu Lee, Jun Yeon Park, Sungwook Chae, Sanghyun Lee (2015), “Analysis of the trans-Cinnamic Acid Content in *Cinnamomum* spp. and Commercial Cinnamon Powder Using HPLC”, *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, Vol. 4, pp. 102-108.
7. Kwon H. K., Jeon W. K., Hwang J. S., Lee C. G., So J. S., Park J. A., Ko B. S. and Im S. H. (2009), “Cinnamon Extract Suppresses Tumor Progression by Modulating Angiogenesis and the Effector Function of CD8+ T Cells”, *Cancer Letters*, 278, pp. 174-182.
8. Pina-Pérez M. C., Martínez-López A. and Rodrigo D. (2012), “Cinnamon Antimicrobial Effect against *Salmonella typhimurium* Cells Treated by Pulsed Electric Fields (PEF) in Pasteurized Skim Milk Beverage”, *Food Research International*, 48, pp. 777-783.
9. Sevdan Yilmaz¹, Matej Sova, Sebahattin Ergün (2018), “Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates”, *Journal of Applied Microbiology*, 09/2018, pp. 4- 5.