

Xác định amygdalin trong hạt và các sản phẩm từ hạt bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ

Nguyễn Hà Thanh*, Trần Trung Thành², Nguyễn Thị Hồng Ngọc¹,
Cao Công Khánh¹, Phạm Thị Thanh Hà²

¹Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 04/10/2022; Ngày chấp nhận đăng: 06/01/2023)

Tóm tắt

Amygdalin là một cyanogenic glycosid, một chất độc tự nhiên có trong hạt các cây họ Hoa Hồng, như hạnh nhân, đào, mơ, và có thể xuất hiện trong các sản phẩm thực phẩm có chứa các loại hạt này. Amygdalin sau khi được hấp thu vào cơ thể sẽ bị thủy phân giải phóng ra acid hydrocyanic có khả năng gây ngộ độc cho con người. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC - MS/MS) với nguồn ion hóa chế độ âm được ứng dụng xây dựng và thẩm định phương pháp xác định amygdalin trên thực phẩm theo hướng dẫn của AOAC. Cloramphenicol được lựa chọn làm chất chuẩn nội. Hệ dung môi pha động sử dụng gồm 2 kênh A (acid formic 0,1%), kênh B (acetonitril) và pha tĩnh là cột symmetry C18 (3 mm × 150 mm, 3,5 μm). Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của amygdalin lần lượt là 15 μg/kg và 50 μg/kg. Khoảng tuyến tính nằm trong khoảng từ 1,68 - 33,6 ng/mL. Phương pháp có độ thu hồi 86,2 - 110,0%, độ lệch chuẩn tương đối trong khoảng 2,8 - 5,0%. Phương pháp sau thẩm định được áp dụng để xác định hàm lượng amygdalin trong một số mẫu hạt và sản phẩm từ nhân hạt có trên thị trường Hà Nội.

Từ khóa: Amygdalin, chloramphenicol, LC - MS/MS, hạt.

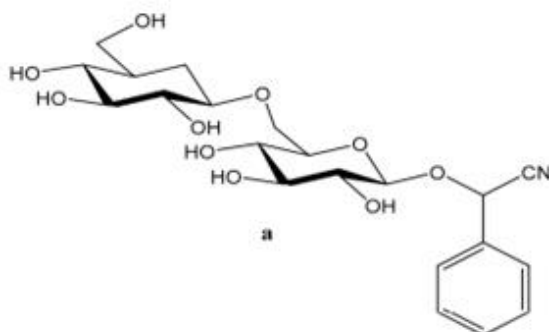
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Amygdalin là một cyanogenic glycoside, một chất độc tự nhiên được phân bố rộng rãi ở thực vật, có trong hạt của các cây thuộc họ *Rosaceae* (họ Hoa hồng), đặc biệt là chi *Prunus* (chi Mận mơ) như hạnh nhân, đào, mơ, anh đào, đào, lê, mận; được phát hiện trong quả chanh dây (loài *Passiflora*) [1]. Amygdalin có công thức phân tử $C_{20}H_{27}NO_{11}$, công thức cấu tạo như Hình 1, gồm một đơn vị acid hydrocyanic (HCN), một đơn vị benzaldehyde và hai đơn vị glucose. Amygdalin, danh pháp IUPAC là [(6-O-β-D-Glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl) oxy] (phenyl)acetonitril, được phân lập lần đầu tiên vào năm 1830 bởi các nhà hóa sinh người Pháp Robiquet và Boutron - Chaland và được nghiên cứu chi tiết bởi nhà hóa học người Đức Emil Fisher. Với các thí nghiệm trên tế bào

*Điện thoại: 0346379977

Email: nht98thanh@gmail.com

in vitro, amygdalin được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học như ức chế xơ hóa thận [2], ức chế hình thành mạch [3], điều hòa nội tiết [4], điều hòa miễn dịch [5], tác dụng bảo vệ dạ dày [6], chống xơ vữa động mạch [7], bảo vệ thần kinh và chống cholinesterase [8].



Hình 1. Công thức cấu tạo của amygdalin [9].

Bản thân amygdalin không gây độc nhưng có thể bị phân giải bởi enzyme β - glucosidase trong ruột non của người tạo acid hydrocyanic (HCN) [9]. Khi được hấp thu, cyanid nhanh chóng được máu phân bố tới toàn cơ thể. Ở người, cyanide được giải độc chủ yếu qua trans-sulfuration để tạo thành thiocyanat nhưng cũng có thể được giải độc bằng phản ứng với hydroxycobalamin (vitamine B12) để tạo thành cyanocobalamin. Thiocyanat được thanh thải qua thận với thời gian khoảng 2,7 ngày với chức năng thận bình thường [10]. Amygdalin đường uống được đánh giá có tác dụng mạnh hơn 40 lần so với dạng tiêm tĩnh mạch do sự chuyển hóa thành hydrogen cyanid bằng enzyme trong đường tiêu hóa [11]. Độc tính của cyanid gây tử vong cao do cản trở việc sử dụng oxy của ty thể dẫn đến chết tế bào, cyanid liên kết với ion sắt trên cytochrom oxidase và làm ngưng đột ngột chuỗi vận chuyển điện tử và chuyển hóa oxy hóa, dẫn đến thiếu oxy tế bào và nhiễm acid lactic [11].

Hiện nay, thế giới và Việt Nam chưa đưa ra giới hạn về hàm lượng amygdalin trong thực phẩm, tuy nhiên các tổ chức quản lý thực phẩm trên thế giới đã thực hiện các biện pháp phòng ngừa để quản lý nguy cơ tiềm ẩn liên quan đến việc tiêu thụ hạt mơ – thực phẩm có khả năng chứa lượng lớn amygdalin. Bộ Y tế Canada đã thiết lập mức tối đa (maximum level - ML) là 20 phần triệu (ppm) với tổng số cyanid có thể chiết xuất được trọng hạt mơ được bán ở Canada dưới dạng thực phẩm. Vào năm 2017, Ủy ban Châu Âu (European Commission - EC) đã thiết lập mức tối đa 20 ppm đối với acid hydrocyanic trong hạt mơ chưa chế biến, nguyên hạt, xay, nghiền, nứt, cắt nhỏ được đưa ra thị trường cho người tiêu dùng (Quy định của Ủy ban EU 2017/1237). Năm 2015, Viện Đánh giá Rủi ro Liên bang Đức (German Federal Institute for Risk Assessment - BfR) đã đưa ra lời khuyên chỉ nên tiêu thụ không quá hai hạt mơ đáng mỗi ngày. Cơ quan Quản lý Thực

phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (US FDA) đã không xây dựng bất kỳ quy định hoặc lời khuyên cụ thể nào liên quan đến việc tiêu thụ hạt mơ như một loại thực phẩm.

Amygdalin được phát hiện bởi phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector UV hoặc PDA [12-13] với giới hạn phát hiện từ 0,75 mg/kg đến 16 mg/kg. Gần đây, phương pháp sắc ký lỏng khối phổ với bộ phân tích tứ cực chập ba (QqQ) [14], b) hoặc bộ phân tích thời gian bay (QTOF) [15] được áp dụng trên nền nhân hạt và huyết tương chuột có thể làm giảm giới hạn phát hiện tới lần lượt là 15 µg/kg và 1,05 ng/mL. Kỹ thuật HPLC-PDA đơn giản, phổ biến nhưng độ nhạy thấp, ở mức mg/kg trong khi kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ với bộ phân tích thời gian bay có chi phí lớn, ít phổ biến. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ với bộ phân tích tứ cực chập ba phổ biến với chi phí thấp hơn, độ nhạy cao được nhóm lựa chọn để đảm bảo việc xác định amygdalin trong thực phẩm kể cả ở hàm lượng thấp (cỡ µg/kg).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu này tập trung phân tích hàm lượng amygdalin trong các loại thực phẩm có nguồn gốc từ các cây họ Rosaceae (họ Hoa hồng): nhân hạt các cây hạnh nhân, mơ, đào,...; bánh hạnh nhân, bánh đào nhân,...

2.2. Hóa chất, chất chuẩn, thiết bị

2.2.1. Hóa chất, chất chuẩn

Chất chuẩn amygdalin, độ tinh khiết 97% được cung cấp bởi hãng Sigma-Aldrich (Mỹ), nội chuẩn chloramphenicol, độ tinh khiết 98% từ Dr. Ehrenstorfer (Đức). Các hóa chất acetonitril, acid formic, methanol là loại tinh khiết phân tích dùng cho sắc ký được cung cấp bởi Merck (Đức). Nước dùng trong nghiên cứu được làm sạch từ hệ thống Milli-QSP (Merck, Đức) của phòng thí nghiệm.

2.2.2. Thiết bị

- Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ hai lần Triple Quad 5500 SCIEX (Mỹ)
- Các thiết bị phòng thí nghiệm khác: cân phân tích độ chính xác 0,1 mg (MS-205DU, Mettler), bể rung siêu âm (Elma, Đức), thiết bị thổi khô N₂ (Organomation, Mỹ).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tối ưu hóa phân tích mẫu trên thiết bị

Tối ưu điều kiện phân mảnh ion mẹ để thu được các ion con và năng lượng va chạm bằng cách tiêm trực tiếp dung dịch chuẩn amygdalin vào hệ thống khối phổ với nguồn ion hóa chế độ âm. Các điều kiện sắc ký lỏng được khảo sát bao gồm: cột sắc ký C18, thành phần pha động: theo chương trình gradient của acid formic 0,1% và acetonitril.

2.3.2. Tối ưu quy trình xử lý mẫu

Quy trình xử lý mẫu ban đầu được tổng hợp từ các tài liệu tham khảo [12-17] gồm các bước: cân 0,3 g vào ống ly tâm 50 mL, thêm chính xác 0,1 mL nội chuẩn

chloramphenicol 500 ng/mL. Dung môi chiết mẫu là methanol hoặc ethanol, rung siêu âm; lọc sang bình cầu 250 mL; cô quay lấy cặn và hòa cặn bằng 5,0 mL ethanol tuyệt đối. Hút chính xác 1,0 mL dịch hòa cặn vào ống ly tâm 15 mL và thổi khô; loại béo bằng dung môi hữu cơ và loại bỏ phần dung môi hữu cơ; bay hơi toàn bộ lượng dung môi hữu cơ còn lại và hòa cặn bằng 1,0 mL methanol; lọc qua màng lọc 0,2 μ m chuyển vào lọ mẫu. Sử dụng hạt mơ đã được xay nhỏ để thực hiện các bước khảo sát, cụ thể như sau:

- Khảo sát dung môi chiết: ethanol tuyệt đối, methanol tuyệt đối, ethanol 70%;
- Khảo sát nhiệt độ siêu âm: 35, 45, 55, 65, 70°C;
- Khảo sát thời gian siêu âm: 20, 30, 60, 90, 120 phút;
- Khảo sát thể tích dung môi chiết: 5, 10, 20, 30, 40, 50 mL;
- Khảo sát dung môi loại béo: n-hexan, diethyl ether, ether dầu hỏa.

2.3.3. Thẩm định phương pháp

Phương pháp được thẩm định theo các tiêu chí bao gồm độ chọn lọc (số điểm IP, tỉ lệ ion, thực hiện phân tích trên mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn), giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng (dựa vào tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu), đường chuẩn (dựng đường chuẩn trên nền mẫu với khoảng tuyến tính 1,5 - 30,0 ng/mL), độ lặp lại và độ thu hồi (làm lặp lại 6 lần ở các mức nồng độ thêm chuẩn 50, 80, 150 μ g/kg) (theo hướng dẫn của AOAC 2016 [18]).

2.3.4. Ứng dụng phương pháp phân tích một số mẫu trên thị trường

Lựa chọn các mẫu có khả năng có amygdalin trên thị trường Hà Nội như: hạt và bột hạt các loại hạt hạnh nhân, hạt mơ, hạt điều... và các loại bánh làm từ các hạt này.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tối ưu hóa phân tích mẫu trên thiết bị

3.1.1. Khảo sát điều kiện khối phổ

Các thông số của thiết bị khối phổ được tối ưu tự động sau khi đã lựa chọn được ion mẹ và các mảnh ion con bao gồm: áp suất khí mang (CUR): 30 psi, áp suất khí (CAD): 7 psi, thế ion hóa (IS): - 4500 V, nhiệt độ nguồn ion (TEM): 400°C, áp suất khí nguồn 1 (GS1): 45 psi, áp suất khí nguồn 2 (GS2): 45 psi. Kết quả lựa chọn các mảnh ion được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả điều kiện khối phổ các chất phân tích

TT	Chất phân tích	Ion mẹ	Ion con	CE (eV)	DP (eV)
1	Amygdalin	502	323*/119	- 19/- 36	- 40/- 100
2	Chloramphenicol	321	152*/176	- 23/- 23	- 103/- 103

*Ion định lượng

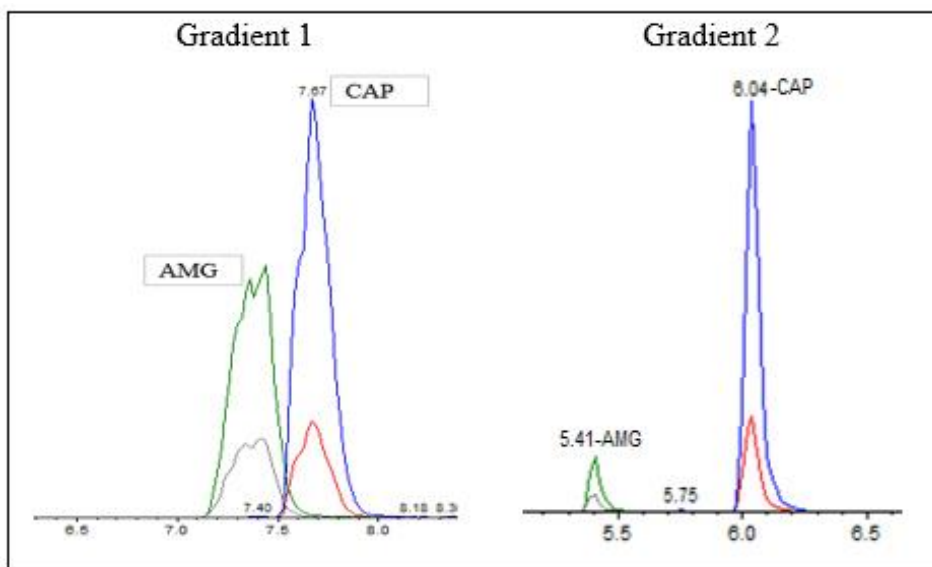
3.1.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Chất phân tích có độ phân cực trung bình, do đó pha tĩnh được lựa chọn là cột C18. Dựa vào điều kiện phòng thí nghiệm cột symmetry C18 (3 mm × 150 mm, 3,5 μm) của Waters được lựa chọn. Pha động được sử dụng là acetonitril và acid formic 0,1%.

Gradient pha động gồm 2 kênh acetonitril và acid formic 0,1% được khảo sát và lựa chọn dựa vào thời gian lưu và hình dạng, độ cân xứng của pic với tốc độ dòng 0,5 mL/phút, thể tích tiêm 5 μL. Các điều kiện và kết quả khảo sát gradient được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 2. Gradient 2 cho pic nhọn với độ cân xứng tốt hơn gradient 1, do đó gradient 2 được chọn để thực hiện các bước khảo sát tiếp theo.

Bảng 2. Các điều kiện gradient được khảo sát

Thời gian (phút)	Gradient 1	Gradient 2
0 - 1,5	1%	1%
1,5 - 4	1 - 70%	1 - 90%
4 - 6	70%	90%
6 - 6,5	70 - 1%	90 - 1%
6,5 - 10	1%	1%



Hình 2. Kết quả khảo sát các chương trình gradient pha động

3.2. Tối ưu quy trình xử lý mẫu

Các khảo sát thực hiện trên mẫu hạt mơ. Kết quả của mỗi lần khảo sát sẽ được so sánh qua thông số là $A = \frac{S_{AMG}}{S_{CAP}} \cdot \frac{1}{m}$ (1/g)

Trong đó: A: tỉ lệ của diện tích pic amygdalin và diện tích pic chloramphenicol trên 1 g mẫu (1/g).

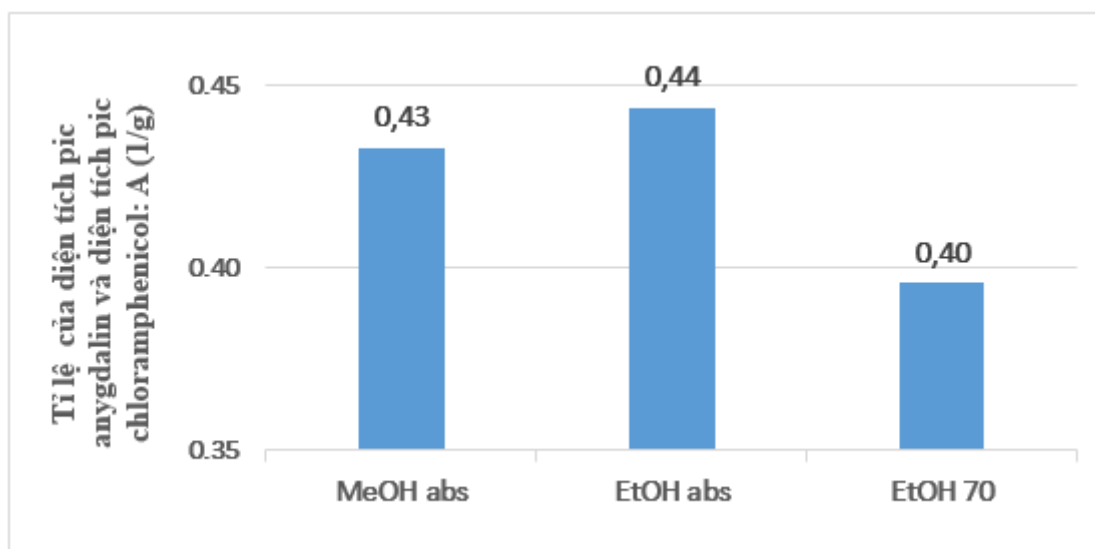
S_{AMG} : diện tích pic của amygdalin (AMG).

S_{CAP} : diện tích pic của chloramphenicol (CAP).

m: khối lượng cân mẫu (g).

3.2.1 Khảo sát dung môi chiết

Ba dung môi được sử dụng để khảo sát là methanol tuyệt đối (MeOH abs), ethanol tuyệt đối (EtOH abs) và ethanol 70% (EtOH 70%). Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 3.



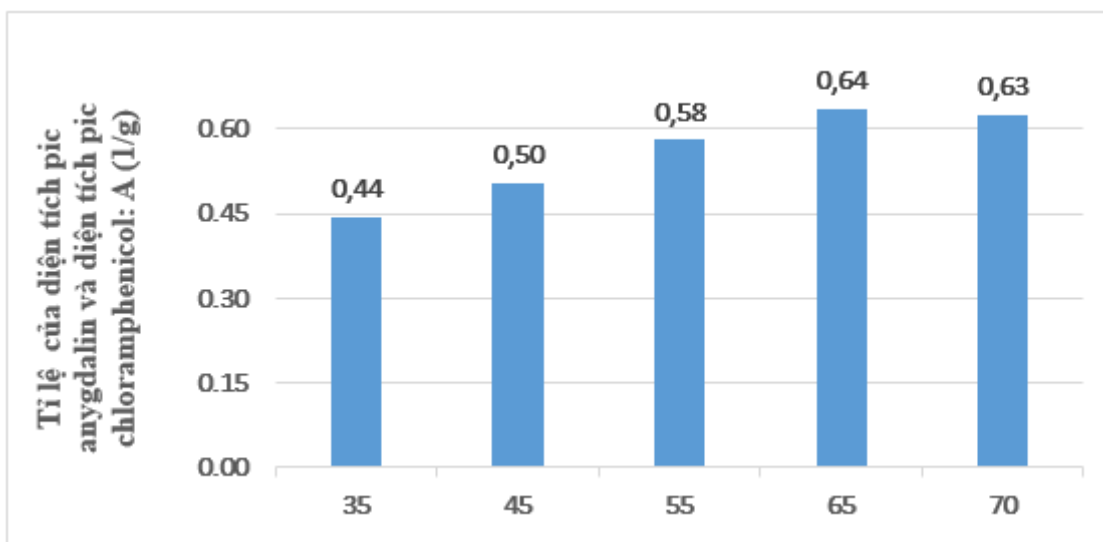
Hình 3. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Kết quả cho thấy lượng mẫu chiết được khi sử dụng ethanol 70% thấp hơn so với methanol và ethanol tuyệt đối. Điều này được giải thích là do amygdalin tan được trong methanol, ethanol và trong nước sôi. Tín hiệu amygdalin giảm khi sử dụng dung môi chiết là ethanol 70% do trong nhân hạt có enzyme gây thủy phân amygdalin và enzyme này tan trong nước [9]. Tín hiệu amygdalin chiết bằng methanol tuyệt đối và ethanol tuyệt đối gần như tương đương, nhưng ethanol tuyệt đối cho kết quả lặp lại tốt hơn ($RSD_{\text{ethanol}} = 2,6\%$, $RSD_{\text{methanol}} = 3,9\%$). Do đó, ethanol tuyệt đối được chọn là dung môi chiết xuất.

3.2.2. Khảo sát nhiệt độ siêu âm

Khảo sát quá trình chiết ở các mức nhiệt độ khác nhau 35°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C và không thay đổi các yếu tố khác. Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 4.

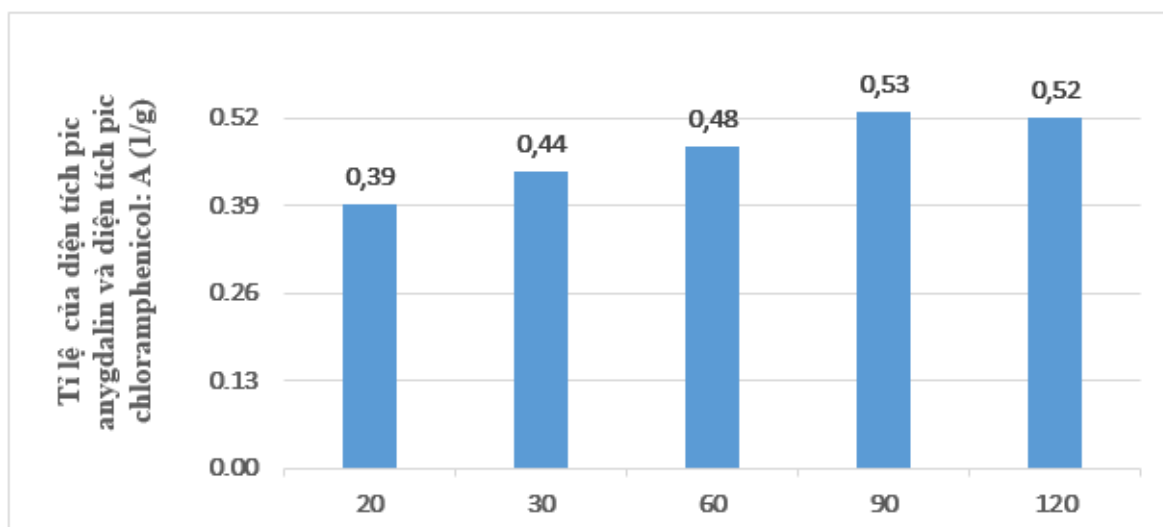
Từ kết quả khảo sát, đáp ứng của chất phân tích ở điều kiện khảo sát 65°C là cao nhất. Lý do là khi tăng nhiệt độ sẽ làm tăng quá trình khuếch tán của chất tan vào dung môi nên có thể hòa tan được nhiều chất phân tích hơn. Đáp ứng của chất phân tích ở điều kiện 65°C và 70°C là tương đương, tuy nhiên nhiệt độ càng cao càng nhiều tạp chất được sinh ra, do đó nhiệt độ bề siêu âm tối ưu cho quy trình chiết là 65°C.



Hình 4. Kết quả khảo sát nhiệt độ siêu âm

3.2.3. Khảo sát thời gian siêu âm

Khảo sát quy trình chiết xuất ở các thời gian khác nhau là 20, 30, 60, 90 và 120 phút đồng thời không thay đổi các yếu tố khác. Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 5.

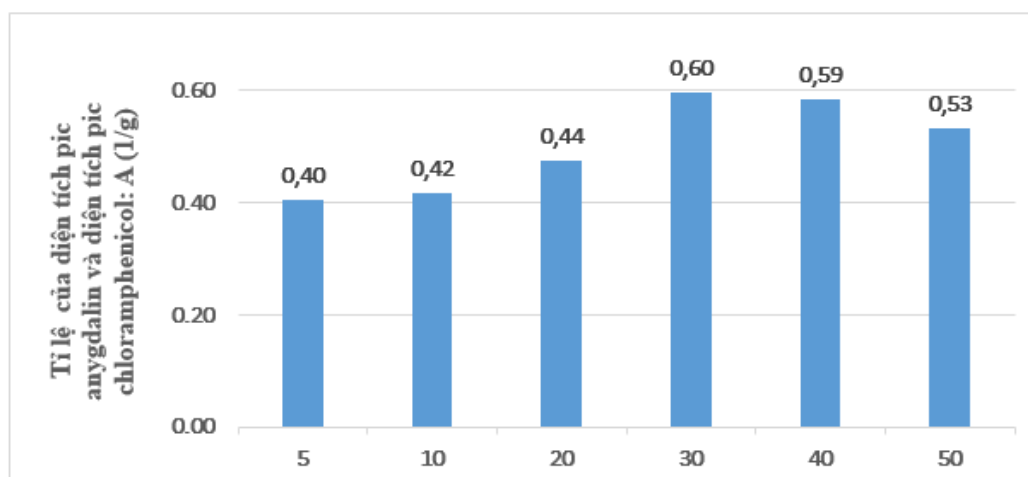


Hình 5. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm

Sau khi khảo sát thời gian siêu âm, đáp ứng của chất phân tích có tăng lên, ở điều kiện 90 phút và 120 phút cho đáp ứng là cao nhất. Sau 90 phút, dù tăng thời gian siêu âm thì đáp ứng gần như không thay đổi, vì vậy để tiết kiệm thời gian nên lựa chọn thời gian siêu âm là 90 phút.

3.2.4. Khảo sát thể tích dung môi

Khảo sát lượng dung môi ethanol tuyệt đối là 5, 10, 20, 30, 40 và 50 mL đồng thời không thay đổi các điều kiện khác. Kết quả được trình bày ở Hình 6.

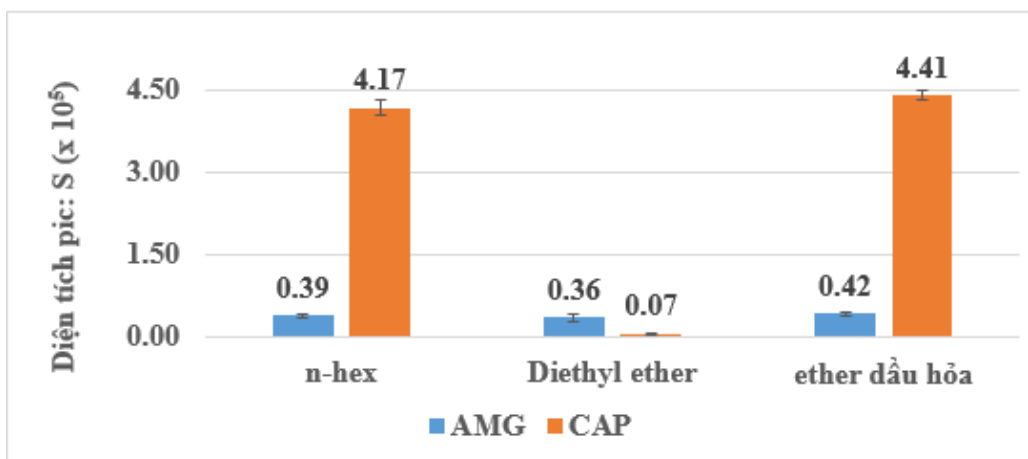


Hình 6. Kết quả khảo sát thể tích dung môi

Sau khi thực hiện khảo sát lượng dung môi thì lượng chất chiết được cũng thay đổi. Đáp ứng của amygdalin đạt cao nhất khi sử dụng 30 hoặc 40 mL ethanol tuyệt đối, tuy nhiên khi sử dụng nhiều dung môi chiết hơn thì cũng tăng lượng tạp chất hòa tan. Lượng thể tích dung môi chiết tối ưu được lựa chọn là 30 mL.

3.2.5. Khảo sát dung môi loại béo

Khảo sát 3 dung môi hữu cơ để loại béo là n-hexan, diethyl ether và ether dầu hỏa. Kết quả được thể hiện trong Hình 7.



Hình 7. Kết quả khảo sát dung môi loại béo

Kết quả cho thấy đáp ứng của amygdalin và cloramphenicol khi dùng ether dầu hỏa là cao hơn khi dùng n-hexan và diethyl ether. Lựa chọn ether dầu hỏa làm dung môi loại béo.

Quy trình xử lý mẫu tối ưu được lựa chọn như sau: cân chính xác khoảng 0,3 g mẫu đã được đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL, thêm chính xác 0,1 mL chloramphenicol 500 ng/mL làm chất chuẩn nội. Thêm 30 mL ethanol tuyệt đối vào ống ly tâm, rung siêu âm ở nhiệt độ 65°C trong 90 phút. Lọc qua giấy lọc vào bình cầu 250 mL. Cô quay dịch lọc ở 60°C và thu lấy cặn. Hòa tan cặn bằng chính xác 5,0 mL ethanol tuyệt đối. Hút chính xác

1,0 mL dịch hòa cần cho vào ống ly tâm 15 mL rồi thổi khô bằng khí N₂. Thêm 5 mL ether dầu hỏa, lắc xoáy vortex, ly tâm và loại bỏ lớp ether dầu hỏa bằng pipet pasteur, để bay hơi toàn bộ lượng dung môi loại béo trong ống ly tâm 15 mL. Hòa tan cần còn lại trong ống bằng 1mL methanol, lọc qua màng lọc 0,2 µm chuyển vào lọ mẫu.

3.3. Thẩm định phương pháp phân tích

Tiến hành thẩm định phương pháp theo AOAC 2016 [18] với các tiêu chí: độ chọn lọc, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, đường chuẩn, độ đúng và độ lặp lại.

3.3.1. Độ chọn lọc

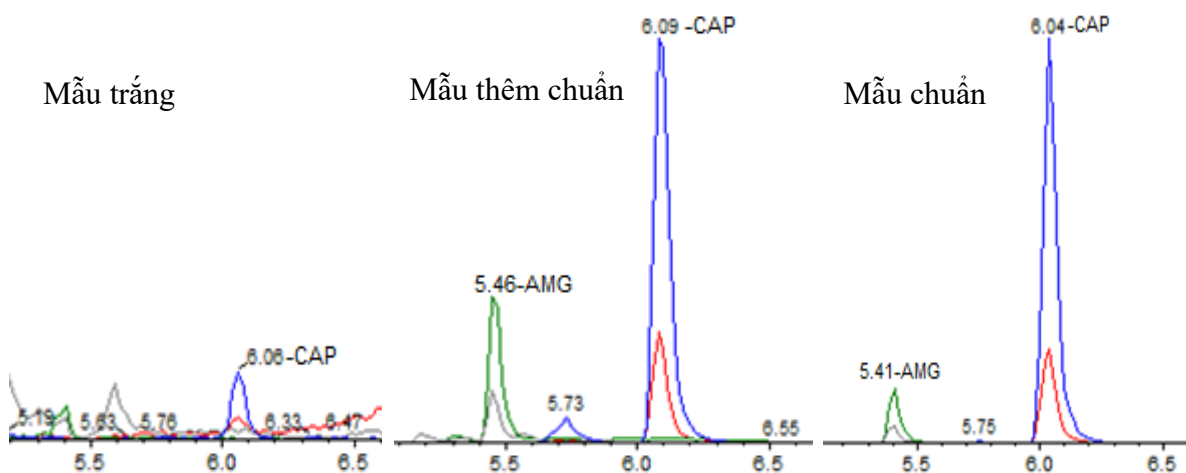
- Số điểm IP bằng 5: Amygdalin có 1 ion mẹ, 2 ion con và phương pháp sử dụng kỹ thuật tách sắc ký lỏng, đáp ứng yêu cầu EU 2021/808.

- Tỷ lệ ion: Phân tích amygdalin trên mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn. Kết quả được trình bày trên Bảng 3.

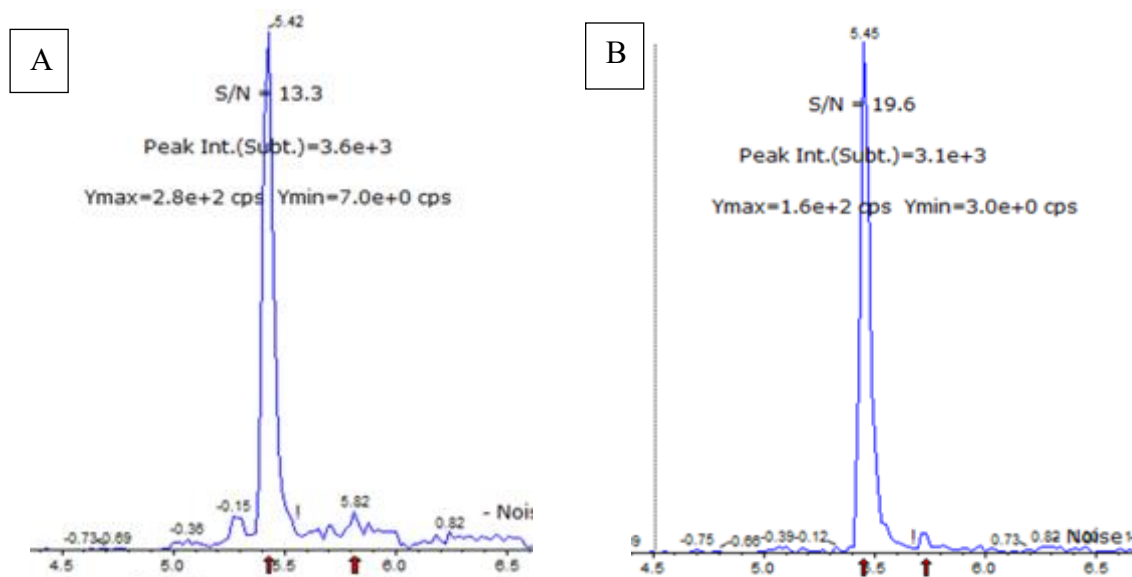
Bảng 3. Tỷ lệ ion của amygdalin

Chất phân tích	Tỷ lệ cường độ ion chuẩn	Sai số cho phép	Khoảng sai số tối đa cho phép	Tỷ lệ cường độ ion trên mẫu thêm chuẩn	
				Nhân hạt	Bánh
Amygdalin	36,1%	± 25%	27,08 - 45,13%	35%	38,6%

Phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn cho thấy: Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu chất phân tích. Mẫu thêm chuẩn trên nền hạt và nền bánh tại Hình 8 và Hình 9 cho tín hiệu tại thời gian lưu lần lượt là 5,46 và 5,42 phút gần với thời gian lưu của chất chuẩn (5,41 phút), mức chênh lệch tuyệt đối không quá ± 0,1 phút, đáp ứng yêu cầu EU 2021/808.



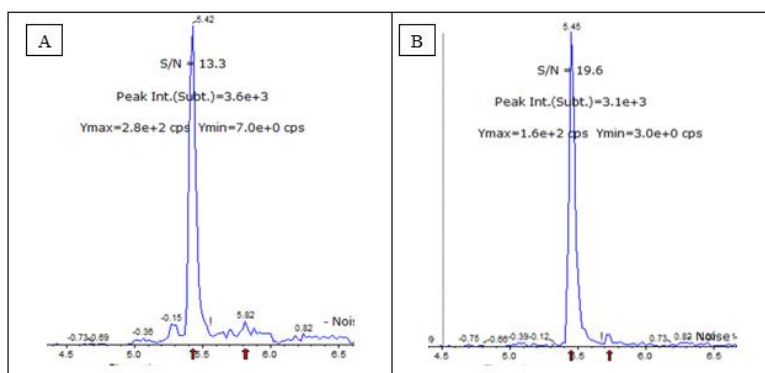
Hình 8. Sắc ký đồ độ đặc hiệu amygdalin



Hình 9. Sắc ký đồ độ đặc hiệu amygdalin trên nền bánh

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

Xác định giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp bằng cách tính tỉ số tín hiệu trên nhiễu (S/N). Thực hiện phân tích các mẫu thêm chuẩn ở các nồng độ thấp dần cho đến khi tỉ lệ S/N = 10 - 20, thì tại nồng độ đó xác định là LOQ. LOD sẽ được tính từ giá trị LOQ : $LOD = LOQ/3,3$. LOD và LOQ trên nền mẫu nhân hạt và trên nền bánh lần lượt là 15 và 50 $\mu\text{g/kg}$.



Hình 10. Sắc ký đồ LOQ trên nền mẫu nhân hạt (A), bánh (B)

3.3.3. Đường chuẩn

Tiến hành thêm chuẩn vào dịch chiết mẫu trắng ở các mức nồng độ 1,68 - 33,6 ng/mL và phân tích trên thiết bị LC-MS/MS. Xây dựng đường phụ thuộc giữa tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích với nội chuẩn và nồng độ tương ứng. Đường chuẩn được lập trên phần mềm Analysis. Kết quả đường chuẩn trên nền bánh: $y = 0,0319x + 0,0022$, bình phương hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,9972$; nền nhân hạt: $y = 0,0256x - 0,0021$; bình phương hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,9995$ với độ chệch < 15% với tất cả các giá trị, đáp ứng yêu cầu EU 2021/808.

3.3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi

Độ lặp lại và độ thu hồi được đánh giá bằng cách thêm chuẩn ở các mức 50, 80 và 150 µg/kg trên nền bánh và nhân hạt đã được xác định không chứa amygdalin. Tiến hành phân tích các mẫu lặp lại 6 lần ở mỗi mức theo quy trình đã xây dựng. Kết quả cho thấy, độ thu hồi của phương pháp trong khoảng 86,2 - 110,0%, độ lệch chuẩn tương đối trong khoảng 2,8 - 5,0%, đáp ứng yêu cầu EU 2021/808. Độ không đảm bảo đo mở rộng được tính toán từ độ thu hồi và độ tái lập, kết quả là 12,8 - 13,3%.

3.4. Ứng dụng phương pháp để phân tích hàm lượng amygdalin

Phương pháp sau khi thẩm định đáp ứng yêu cầu đã được áp dụng để phân tích hàm lượng amygdalin các mẫu thực mua ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội, bao gồm: mẫu hạt hạnh nhân, hạt mơ đắng, hạt điều, hạt dẻ cười, hạt hạnh nhân cắt lát, bột hạnh nhân, bánh hạnh nhân và bánh mỳ hạt. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích các mẫu thực

<i>STT</i>	<i>Mẫu</i>	<i>Hàm lượng (mg/kg)</i>
1	Hạt mơ đắng	34.550
2	Hạt hạnh nhân	12,0
3	Hạt điều sấy	Không phát hiện
4	Hạt hạnh nhân cắt lát	0,97
5	Bột hạnh nhân	10,7
6	Hạt macca	Không phát hiện
7	Hạt dẻ cười	Không phát hiện
8	Bánh quy hạnh nhân	0,33
9	Bánh mỳ hạnh nhân	0,29
10	Bánh mỳ hạt	Không phát hiện

Kết quả tại Bảng 4 cho thấy các mẫu thực phẩm có nguồn gốc hạt mơ hoặc hạt hạnh nhân đều phát hiện amygdalin, trong đó hạt mơ đắng có hàm lượng amygdalin rất cao, 34.550 mg/kg, phù hợp với nghiên cứu của Karsavuran [13] có hàm lượng amygdalin trong hạt mơ đắng: 26 ± 14 mg/g. Điều này cho thấy amygdalin xuất hiện phổ biến trong các loại thực phẩm trên thị trường Hà Nội. Tuy nhiên số lượng mẫu trong nghiên cứu còn quá nhỏ (10 mẫu), chưa đủ để đưa ra kết luận mang tính đại diện. Điều này đòi hỏi những nghiên cứu tiếp theo trên số lượng mẫu lớn hơn và các nền mẫu khác để đánh giá hàm lượng amygdalin trong thực phẩm, cũng như nguy cơ của các thực phẩm này tới con người.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp xác định amygdalin trong thực phẩm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ hai lần chính xác được xây dựng và thẩm định đạt theo tiêu chí của AOAC 2016. Độ thu hồi của phương pháp trong khoảng 86,2 - 110,0%, độ lệch chuẩn tương đối trong khoảng 2,8 - 5,0%, đáp ứng yêu cầu EU 2021/808. Độ không đảm bảo đo mở rộng được tính toán từ độ thu hồi và độ tái lập, kết quả là 12,8 - 13,3% phù hợp và tin cậy để phân tích các hạt và sản phẩm từ hạt trên thị trường. Kết quả phân tích cho thấy các sản phẩm từ hạt mơ hoặc hạt hạnh nhân đều chứa amygdalin và các mẫu bánh có nguyên liệu nguồn gốc từ hạt hạnh nhân có phát hiện amygdalin nhưng ở mức hàm lượng thấp hơn nhiều nhiều so với mức khuyến cáo của Ủy ban Châu Âu đưa ra năm 2017 và Bộ Y tế Canada.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia đã tài trợ kinh phí và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. D. Chassagne, J. C. Crouzet, C. L. Bayonove, and R. L. Baumes, "Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 12, pp. 3817-3820, 1996.
- [2]. J. Guo, W. Wu, M. Sheng, S. Yang, and J. Tan, "Amygdalin inhibits renal fibrosis in chronic kidney disease," *Molecular Medicine Reports*, vol. 7, no. 5, pp. 1453-1457, 2013.
- [3]. H. Mirmiranpour, S. Khaghani, A. Zandieh, O. O. Khalilzadeh, S. Gerayesh-Nejad, A. Morteza, and A. Esteghamati, "Amygdalin inhibits angiogenesis in the cultured endothelial cells of diabetic rats," *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, vol. 55, no. 2, pp. 211-214, 2012.
- [4]. M. Halenar, L. Chrastinova, L. Ondruska, R. Jurcik, K. Zbynovska, E. Tusimova, and A. Kolesarova, "The evaluation of endocrine regulators after intramuscular and oral application of cyanogenic glycoside amygdalin in rabbits," *Biologia*, vol. 72, no. 4, pp. 468-474, 2017.
- [5]. A. Baroni, I. Paoletti, R. Greco, R. Satriano, E. Ruocco, M. Tufano, J. Perez, "Immunomodulatory effects of a set of amygdalin analogues on human keratinocyte cells," *Experimental Dermatology*, vol. 14, no. 11, pp. 854-859, 2005.
- [6]. F. Nabavizadeh, A. M. Alizadeh, Z. S. Adroslami, S. Adeli, "Gastroprotective effects of amygdalin on experimental gastric ulcer: Role of NO and TNF-alpha," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5, no. 14, pp. 3122-3127, 2011.

- [7]. D. Jiagang, H. Wang, Y. Liu, , C. Li, E. Hao, Z. Du, C. Bao, J. Lv, and Y. Wang, “Anti-atherosclerotic effects mediated by the combination of probucol and amygdalin in apolipoprotein e-knockout mice fed with a high fat diet,” *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 11, no. 1, pp. 20-25, 2012.
- [8]. Y. Cheng, C. Yang, J. Zhao, H. F. Tse, and J. Rong, “Proteomic identification of calcium-binding chaperone calreticulin as a potential mediator for the neuroprotective and neuritogenic activities of fruit-derived glycoside amygdalin,” *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 26, no. 2, pp. 146-154, 2015.
- [9]. E. Jaszczak-Wilke, A. Polkowska, M. Koprowski, K. Owsianik, A. E. Mitchell, and P. Bałczewski, “Amygdalin: toxicity, anticancer activity and analytical procedures for its determination in plant seeds,” *Molecules*, vol. 26, no. 8, pp. 2253, 2021.
- [10]. V. Schulz, R. Bonn, J. Kindler, “Kinetics of elimination of thiocyanate in 7 healthy subjects and 8 subjects with renal failure,” *Klin Wochenschr*, vol. 57, pp. 243-247, 1979.
- [11]. T. Dang, C. Nguyen, and P. N. Tran, “Physician beware: severe cyanide toxicity from amygdalin tablets ingestion,” *Case Reports in Emergency Medicine*, vol. 2, pp. 1-3, 2017.
- [12]. I. F. Bolarinwa, C. Orfila, and M. R. Morgan, “Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK,” *Food Chemistry*, vol. 152, pp. 133-139, 2014.
- [13]. N. Karsavuran, M. Charehsaz, H. Celik, B. M. Asma, C. Yakıncı, and A. Aydın, “Amygdalin in bitter and sweet seeds of apricots,” *Toxicological & Environmental Chemistry*, vol. 96, no. 10, pp. 1564-1570, 2014.
- [14]. T. Tanaka, K. Kimura, K. Kan, Y. Katori, K. Michishita, H. Nakano, and T. Sasamoto, “Quantification of amygdalin, prunasin, total cyanide and free cyanide in powdered loquat seeds,” *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 37, no. 9, pp. 1503-1509, 2020.
- [15]. M. Gao, Y. Wang, H. Wei, H. Ouyang, M. He, L. Zeng, F. Shen, Q. Guo and Y. Rao, “Qualitative and quantitative analysis of amygdalin and its metabolite prunasin in plasma by ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time of flight mass spectrometry and ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry,” *Chinese Journal of Chromatography*, vol. 32, no. 6, pp. 591, 2014.
- [16]. V. D. Nikolic, I. M. Savic, L. B. Nikolic, and M. Z. Stankovic, “Development and validation of HPLC method for the determination of amygdalin in the plant extract of

- plum kernel,” *Research Journal of Chemistry and Environment*, vol. 16, no. 4, pp. 80-86. 2012.
- [17]. I. M. Savic, V. D. Nikolic, I. M. Savic-Gajic, L. B. Nikolic, S. R. Ibric, and D. G. Gajic, “Optimization of technological procedure for amygdalin isolation from plum seeds (*Pruni domesticae semen*),” *Frontiers in Plant Science*, vol. 6, pp. 276, 2015.
- [18]. AOAC Official Methods of Analysis, *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*, 2012.

Determination of amygdalin in kernels and their products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Nguyen Ha Thanh¹, Tran Trung Thanh^{1,2}, Nguyen Thi Hong Ngoc¹,
Cao Cong Khanh¹, Pham Thi Thanh Ha²

¹National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

Abstract

Amygdalin is a cyanogenic glycoside, a natural toxicant in *Rosaceae* spp. such as almonds, peaches, and apricots, and may appear in products containing them. Amygdalin, after being absorbed into the body, will be hydrolyzed and release hydrocyanic acid, which is capable of causing poisoning in humans. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with negative mode electrospray ionization and multi-reaction monitoring (MRM) mode was used to develop and validate a method for determining amygdalin on food according to AOAC guidelines. Chloramphenicol was chosen as the internal standard. The mobile phase consists of two channels: channel A (formic acid 0.1%), channel B (acetonitril) and the solid phase is symmetry C18 column (3 mm × 150 mm, 3.5 μm). The method has been validated according to AOAC 2016 guidelines. The limit of detection and limit of quantitation of amygdalin in food was 15 and 50 μg/kg, respectively. The linearity ranges from 1.68 to 33.6 ng/mL. Recovery was from 86.2 to 110.0 %, and the relative standard was from 2.8 to 5.0 %. The validated method is applied to determine amygdalin content in some kernels and their products on Hanoi's market.

Keywords: amygdalin, chloramphenicol, LC-MS/MS, kernel.