

XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CAO CHỨA ACID CHLOROGENIC (CGA) TRONG HẠT CÀ PHÊ XANH

Đến tòa soạn 28-02-2021

Nguyễn Xuân Hải, Nguyễn Văn Hoàng Danh, Lê Hữu Thọ, Đỗ Văn Nhật Trường, Nguyễn Thị Thanh Mai
Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, Đại Học Quốc Gia Tp. HCM

Đặng Thành Chung, Cấn Văn Mão
Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân Y

Lê Văn Quân

Khoa Chẩn đoán Chức năng, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân Y

SUMMARY

STUDY ON THE EXTRACTION METHOD FOR CHLOROGENIC ACID (CGA) IN GREEN COFFEE BEANS

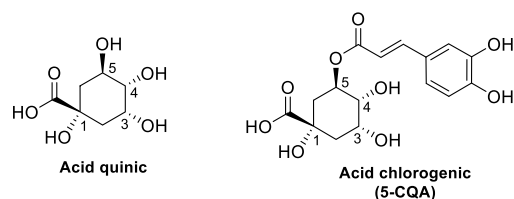
Acid chlorogenic (CGA) is a major component of green coffee beans with a wide range of bioactive as treatment of diabetes, obesity, ... By microwave technique with solvent system of EtOH-H₂O (7:3) in 45 min x 4 times as well as liquid-liquid extraction technique with optimal conditions, we had collected the EtOAc extract having CGA content of 51%. The result will be able to supplement in the pharmaceutical source and is the first step to developing functional foods from extract green coffee beans to treat diabetes and obesity.

Keywords: CGA, extract, green coffee beans.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Cà phê là thực vật thuộc họ Thiến thảo (Rubiaceae) có nguồn gốc từ cao nguyên phía Tây Nam Ethiopia và cao nguyên Boma ở Sudan. Cây cà phê được tìm thấy nhiều ở Tây nguyên và các tỉnh miền nam Việt Nam. Nhiều nghiên cứu cho thấy hạt Cà phê xanh chứa các thành phần polyphenol quan trọng và hầu hết là các dẫn xuất của acid quinic và các acid *trans*-cinnamic. Thành phần chiếm vai trò quan trọng là CGA, chiếm đến 14 % hàm lượng hoạt chất có trong hạt cà phê xanh.[1, 2] CGA bao gồm một họ các hợp chất ester hình thành giữa acid quinic và các acid *trans*-cinnamic, trong đó acid 5-*O*-caffeoylquinic (5-CQA) chiếm hơn 50 % tổng số các CGA. Vì vậy, UIPAC thống nhất khi gọi CGA tức chỉ hợp chất 5-CQA hay còn gọi là acid chlorogenic (Hình 1).[3] Đây là các hợp chất quan trọng có hoạt

tính sinh học đa dạng trong hạt Cà phê xanh, đặc biệt trong điều trị bệnh đái tháo đường và giảm béo phì. Do đó, nghiên cứu này nhằm mục đích xây dựng quy trình chiết xuất chứa hàm lượng lớn CGA từ các loài cà phê Robusta được trồng ở Việt Nam.



Hình 1. Hợp chất acid quinic và acid chlorogenic

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Mẫu trái Cà phê Arabica, Robusta, Mít, Culi, Moka được thu hái ở tỉnh Đắk Lắk vào tháng 12/2016. Sau khi thu hái, trái cà phê tươi sau

khi đem về được phơi khô, tách vỏ lấy hạt. Hạt được xay nhỏ và được lưu trữ ở nhiệt độ phòng tại nơi thoáng mát.

2.2. Hóa chất và thiết bị

Dung môi *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, EtOH, MeOH (Trung Quốc, độ tinh khiết >99%); dung môi MeOH, H₃PO₄, acid citric (Merck, độ tinh khiết 99 %); chất chuẩn acid chlorogenic (CGA) (Sigma-Aldrich, độ tinh khiết 95%); màng lọc MCE (Mixed Cellulose Ester) 0.45 μm (Chromfilter); nước cất 2 lần và các hóa chất sử dụng cho phân tích HPLC-UV. Thiết bị phân tích sắc lỏng hiệu năng cao gắn đầu dò UV-VIS SPD-20A của Shimadzu, bơm cao áp 4 dòng dung môi LC-20AD của Shimadzu. Hệ thống ly trích Soxhlet EME 60250. Hệ thống cô quay EYELA N-1200AV. Thiết bị UV cầm tay UVGL-58. Bồn siêu âm S180H, cân phân tích và một số dụng cụ thiết yếu khác.

2.3 Điều kiện phân tích định lượng acid chlorogenic bằng HPLC-UV

Quy trình phân tích HPLC-UV hạt cà phê xanh được tham khảo từ nghiên cứu của tác giả Y. Koshiro [4], tác giả L.S. Ling [5] và tối ưu theo điều kiện phân tích tại phòng thí nghiệm Hóa Dược, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Hệ thống HPLC-UV Shimadzu sử dụng cột Kromasil 100-5C18 250 × 4.6 mm E74415, hệ pha động 75 % đệm acid citric (pH 2.7) và 25 % MeOH, tốc độ dòng 1 mL/phút, nhiệt độ cột 25 °C, áp suất 176 bar, thể tích tiêm 20 μL. Đầu dò UV-VIS phân tích ở bước sóng 325 nm định lượng acid chlorogenic, acid caffeic và 273 nm để định lượng caffeine.

Dung dịch chuẩn được chuẩn bị bằng cách cân chính xác khoảng 2 mg chất chuẩn rồi hòa tan trong 2 mL MeOH. Tiến hành pha đường chuẩn với các nồng độ 1, 5, 10, 20, 50, 100 ppm.

Mẫu thử/cao chiết hạt Cà phê được hòa tan trong 1.5 mL MeOH hoặc 1.5 mL MeOH-H₂O (5:5), sau đó lọc qua màng lọc MCE (Mixed Cellulose Ester) 0.45 μm trước khi tiến hành phân tích HPLC-UV.

2.4. Xây dựng quy trình chiết xuất cao trích hạt Cà phê xanh

2.4.1. Lựa chọn dung môi chiết xuất

Nghiên cứu tham khảo theo patent WO2015189857A1 (2015) của Goel, Pawan Kumar [6] cùng với quy trình chiết xuất CGA của Rakotomalala (1992) [7], nghiên cứu này sử dụng EtOH thay MeOH vì có độ độc với cơ thể thấp hơn và độ phân cực gần tương đương để khảo sát các điều kiện tối ưu. Tiến hành khảo sát quy trình ly trích với các hệ dung môi: MeOH-H₂O (7:3), EtOH, EtOH-H₂O (7:3, 5:5, 3:7) và H₂O.

2.4.2. Lựa chọn phương pháp chiết xuất

Trích siêu âm: thực hiện với 5g mẫu bột hạt cà phê xanh được cho vào erlen 100 mL, thêm 20 mL với các dung môi và siêu âm trong 30 phút ở nhiệt độ 30-35 °C. Dịch trích được lọc áp suất kém thu được dịch lọc và cô quay chân không thu được cao trích. Cao trích được làm khô hoàn toàn để tính hiệu suất ly trích cao bằng phương pháp khối lượng. Mẫu cao khô được phân tích hàm lượng CGA bằng phương pháp HPLC-UV.

Trích Soxhlet: thực hiện với 5g mẫu bột hạt cà phê xanh được trích Soxhlet với 120 mL hệ dung môi tương ứng trong 5 tiếng. Sau đó, dịch trích được cô quay chân không và tiến hành làm khô hoàn toàn để tính hiệu suất ly trích cao bằng phương pháp khối lượng. Mẫu cao khô được phân tích hàm lượng CGA bằng phương pháp HPLC-UV.

2.4.3. Phương pháp chiết xuất CGA

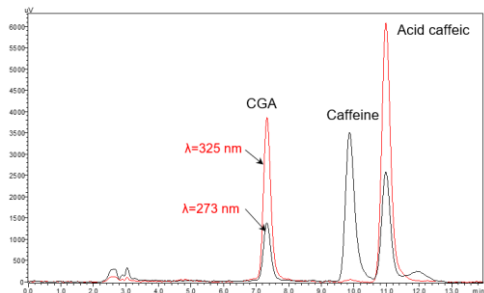
Nghiên cứu tham khảo theo patent WO2015189857A1 (2015) của Goel, Pawan Kumar [6] cùng với quy trình chiết xuất CGA của Rakotomalala (1992) [7] và tối ưu theo các điều kiện phòng thí nghiệm tại Việt Nam. Hạt cà phê xanh Robusta được chiết siêu âm với hệ dung môi EtOH-H₂O (7:3) thu được dịch trích nước. Dịch trích nước sau đó được tiến hành các khảo sát trong quy trình chiết lỏng-lỏng với các hệ dung môi.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đường chuẩn của CGA

Sắc ký đồ của chuẩn CGA, caffeine, acid caffeic được đo tại bước sóng 325 nm và 273

nm. Dựa vào sắc ký đồ, thời gian lưu (t_R) của CGA, caffeine, acid caffeic lần lượt là 7.4 phút, 9.8 phút và 11.0 phút (Hình 2). Như vậy, quy trình phân tích sử dụng bước sóng 325 nm để tiến hành định lượng CGA. Phương trình hồi quy tuyến tính của CGA là $y = 56934x - 28285$, nồng độ 1-100 ppm, $R^2 = 0.9995$.

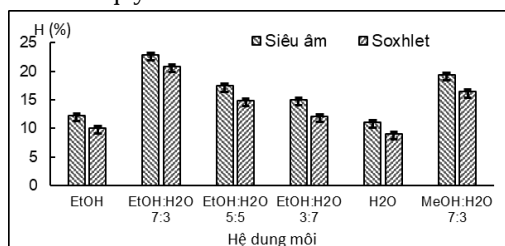


Hình 2. Sắc ký đồ của chuẩn hỗn hợp CGA, caffeine, acid caffeic tại 2 bước sóng 273 nm và 325 nm

3.2. Khảo sát hiệu suất ly trích cao hạt cà phê xanh

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết xuất

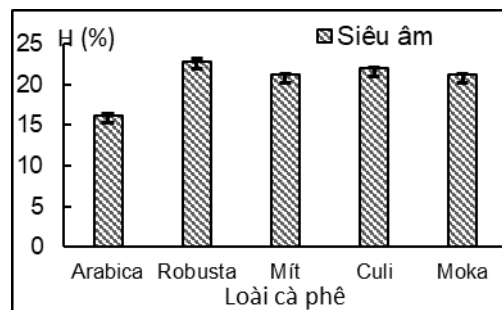
Tiến hành khảo sát chiết xuất hạt cà phê Robusta với hệ dung môi H_2O và EtOH với các tỉ lệ khác nhau, kết quả phân tích hàm lượng CGA được thể hiện trong hình 3 cho thấy hệ dung môi ly trích EtOH- H_2O (7:3) cho hàm lượng CGA cao nhất (20-23 %), hệ dung môi H_2O cho hàm lượng CGA thấp nhất (9-11 %), và các hệ dung môi EtOH- H_2O (7:3, 5:5 và 3:7) cho kết quả hàm lượng CGA gần tương đương hệ dung môi MeOH- H_2O (7:3). Kết quả còn cho thấy hệ trích siêu âm với hệ dung môi ly trích EtOH- H_2O (7:3) cho hàm lượng CGA cao hơn hệ trích Soxhlet. Vì vậy, sử dụng phương pháp trích siêu âm với hệ dung môi EtOH- H_2O (7:3) được xem là phương pháp tốt nhất cho quy trình chiết xuất.



Hình 3. Hàm lượng CGA của hạt cà phê xanh Robusta bằng phương pháp ly trích siêu âm và soxhlet

3.2.2. Khảo sát loài cà phê chiết xuất CGA tối ưu

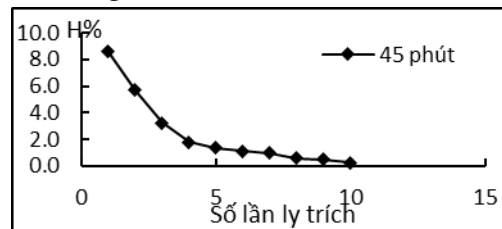
Sử dụng hệ trích tối ưu, tiến hành khảo sát so sánh hàm lượng CGA trong các loại hạt cà phê xanh của các loài khác nhau. Kết quả phân tích HPLC-UV hàm lượng CGA được thể hiện trong hình 4 cho thấy các loại hạt cà phê xanh Robusta, Mít, Culi, Moka cho hàm lượng CGA cao (18-23 %) và cà phê Arabica cho hàm lượng CGA thấp nhất (16 %). Bên cạnh đó, cà phê Robusta chiếm sản lượng lớn, giá thành thấp và là loài cà phê đặc trưng của Việt Nam. Vì những yếu tố phân tích trên, hạt cà phê xanh Robusta được chọn cho nghiên cứu xây dựng quy trình chiết xuất CGA.



Hình 4. Hàm lượng CGA của các loài cà phê bằng phương pháp ly trích siêu âm

3.2.3. Khảo sát số lần trích siêu âm

Quy trình ly trích sử dụng hệ thống nhỏ, tiến hành với 5g mẫu, thể tích dung môi là 30mL và thời gian chiết xuất 45 phút. Tiến hành khảo sát số lần chiết siêu âm, hiệu suất chiết xuất được trình bày trong hình 5 cho thấy lượng cao trích đã được ly trích tương đối kiệt sau 4 lần chiết. Vì vậy, trong khảo sát này số lần ly trích tối ưu là 4 lần với thời gian đánh siêu âm mỗi lần 45 phút, thể tích dung môi chiết là 30mL đối với 5g mẫu.



Hình 5. Đồ thị biểu diễn hiệu suất ly trích siêu âm theo số lần khảo sát

3.3. Xây dựng quy trình chiết xuất CGA bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng

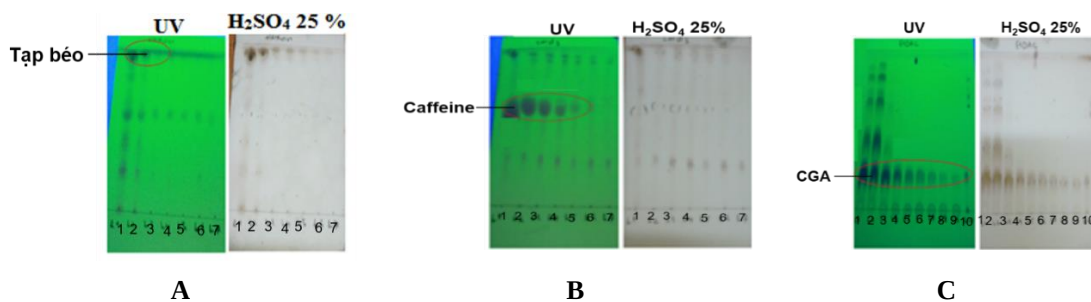
3.3.1. Khảo sát pH chiết lỏng-lỏng

CGA ($pK_a=2.66$) là một acid hữu cơ nên khi acid hóa dịch trích thì CGA tồn tại ở dạng phân tử (trung hòa điện) để dễ dàng chiết lỏng-lỏng vào pha hữu cơ EtOAc. Tiến hành acid hóa về các giá trị pH khác nhau tại pH = 1, 4, 7 bằng H_3PO_4 đậm đặc rồi tiến hành chiết lỏng-lỏng cho kết quả hàm lượng CGA trong cao EtOAc cho kết lần lượt là 45.41 ± 0.36 , 27.06 ± 0.34 và 21.75 ± 0.34 %. Vì vậy, trong khảo sát này sử dụng H_3PO_4 đậm đặc chỉnh pH dịch trích về pH=1 cho hàm lượng CGA trong cao EtOAc cao nhất. Kết quả cũng cho thấy pH càng tăng thì hàm lượng CGA càng thấp.

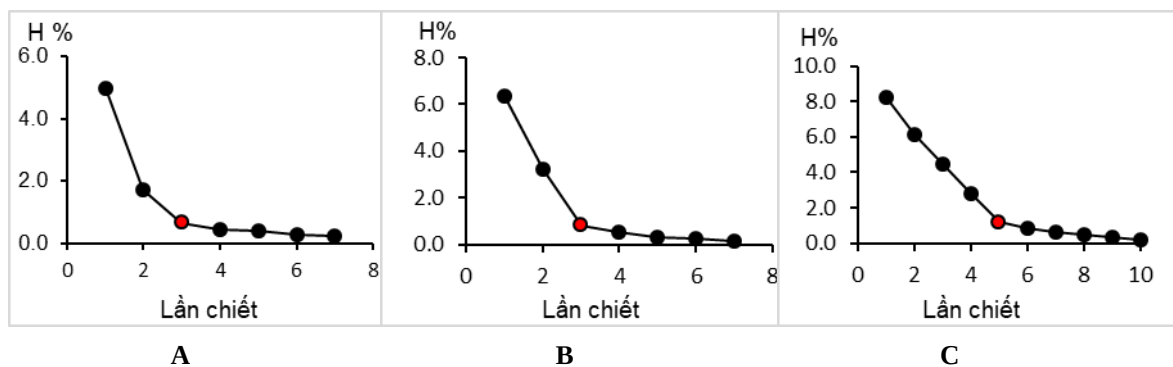
3.3.2. Khảo sát số lần chiết lỏng-lỏng với các dung môi *n*-hexane, $CHCl_3$ và EtOAc

Trong khảo sát này, dịch trích ban đầu được phân tán đều trong nước và chỉnh về pH=1

bằng H_3PO_4 đặc; sau đó tiến hành chiết lỏng-lỏng lần lượt với *n*-hexane, $CHCl_3$ và EtOAc thu được các dịch chiết, tiến hành cô quay chân không thu hồi dung môi thu được cao chiết tương ứng. Sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi thích hợp kết hợp hiện hình bằng phương pháp hấp thụ tia UV tại bước sóng 254 nm và thuốc thử H_2SO_4 25%. Kết quả sắc ký bản mỏng (Hình 5) cho thấy mục đích chiết dung môi hexane để loại tạp chất béo và các hợp chất màu, $CHCl_3$ để loại caffeine và EtOAc để thu được CGA. Khảo sát số lần chiết xuất đối với từng loại dung môi cho thấy cho thấy lượng tạp chất béo và caffeine được loại nhiều nhất qua 3 lần chiết *n*-hexane và $CHCl_3$, hàm lượng CGA được chiết kiệt trong 5 lần chiết (Hình 6). Như vậy, kỹ thuật chiết lỏng-lỏng 3 lần với hexane (tỉ lệ 1:1), 3 lần với $CHCl_3$ (tỉ lệ 1:1) và 5 lần với EtOAc (tỉ lệ 1:1) cho kết quả tối ưu nhất.



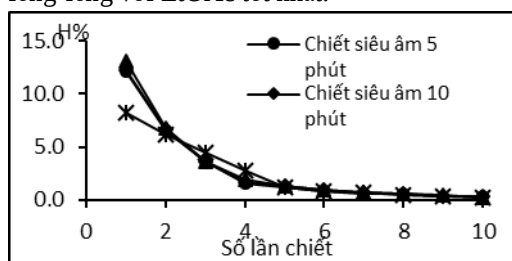
Hình 5. Sắc ký lớp mỏng các lần chiết lỏng-lỏng cao chiết hexane (A), $CHCl_3$ (B) và EtOAc (C)



Hình 6. Hiệu suất chiết hàm lượng qua các lần chiết lỏng-lỏng cao chiết hexane (A), $CHCl_3$ (B) và EtOAc (C)

3.3.3. Khảo sát phương pháp chiết lỏng-lỏng với EtOAc

Cao chiết được phân tán hoàn toàn vào nước, chỉnh về pH=1 bằng H_3PO_4 rồi chiết lỏng-lỏng với hexane, $CHCl_3$ và được chiết siêu âm với EtOAc ở các thời gian khảo sát lần lượt là 5, 10, 15 phút. Kết quả trong hình 7 cho thấy phương pháp chiết lỏng-lỏng bằng phương pháp siêu âm có hiệu suất chiết tốt hơn phương pháp chiết lỏng-lỏng thông thường. Qua 4 lần chiết trong phương pháp chiết siêu âm, hàm lượng CGA hầu như đã được chiết kiệt. Ngoài ra, khảo sát thời gian chiết siêu âm cho thấy hiệu suất chiết siêu âm trong 5 phút tương đương với 10, 15 phút. Vì vậy, trong khảo sát này phương pháp chiết siêu âm với EtOAc trong 5 phút $\times$ 4 lần cho kết quả hiệu suất chiết lỏng-lỏng với EtOAc tốt nhất.



Hình 7. Hiệu suất chiết siêu âm và chiết lỏng-lỏng cao EtOAc qua các thời gian chiết

3.4. Thử nghiệm quy trình chiết xuất tối ưu

Sau khi đã tối ưu tất cả các điều kiện, tiến hành thử nghiệm chiết siêu âm 5 g bột hạt cà phê xanh Robusta với 30 mL dung môi EtOH-H₂O (7:3) $\times$ 4 $\times$ 45 phút. Kết quả cho thấy hiệu suất ly trích cao là 21 % và hàm lượng CGA thu được là 23 %, tức hàm lượng CGA trong hạt cà phê xanh Robusta là 5 %. Từ cao chiết này, sử dụng quy trình chiết xuất CGA thông qua các điều kiện tối ưu, kết quả thu được cao EtOAc với hiệu suất chiết toàn phần từ mẫu hạt Cà phê xanh Robusta là 6 % và hàm lượng CGA trong cao EtOAc chiếm 51 %.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tối ưu quy trình ly trích và quy trình chiết xuất cao chiết chứa hàm lượng CGA lớn nhất từ hạt cà phê xanh Robusta. Sử dụng phương pháp chiết siêu âm với hệ dung môi ly trích EtOH-H₂O (7:3), kết hợp kỹ thuật chiết lỏng-lỏng siêu âm thu được cao EtOAc chứa hàm lượng CGA cao với 51 %. Nghiên cứu góp phần bổ sung vào cơ sở dữ liệu về

Hóa dược, tạo tiền đề để phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường và béo mỡ bụng từ chiết xuất cà phê xanh chứa hàm lượng lớn CGA.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được đảm bảo kinh phí từ ngân sách Bộ Quốc Phòng cho đề tài nghị định thư “nghiên cứu tác dụng của cao chiết hạt cà phê xanh lên chuyển hoá lipid, lên hệ tim mạch, hệ thần kinh và chuyển hoá tế bào gan trên thực nghiệm” với mã số: 2020.75.33.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. W.J. Rogers, S. Michaux, M. Bastin, P. Bucheli (1999), “Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*C. canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees”, *Plant Science*, 149, 115-123.
2. V.R. Preedy (2014), “Coffee in health and disease prevention”, *Academic Press*, United States.
3. A. Farah, C.M. Donangelo (2006), “Phenolic compounds in coffee”, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 23-36.
4. Y. Koshiro, M.C. Jackson, R. Katahira, M.L. Wang, C. Nagai, H. Ashihara (2007), “Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants”, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62, 731-742.
5. L.S. Ling, N.I.N Daud, O. Hassan (2001), “Determination of coffee content in coffee mixtures”, *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 7, 327-332.
6. G.P. Kumar (2015), “Green coffee bean extract and method thereof”, *WIPO Patent Application WO/2015/189857*.
7. J.J.R. Rakotomalala (1992), “Diversité biochimique des caféiers: analyse des acides hydroxycinnamiques, bases puriques et diterpènes glycosides. Particularités des caféiers sauvages de la region malgache (Mascarocoffea Chev.)” *Université Sciences et Techniques du Languedoc*, Doctoral dissertation, Thesis, Collection TDM, ORSTOM, Paris.