



# Xây dựng phương pháp định lượng hợp chất 3-O-Caffeoyquinic acid trong hạt cà phê xanh ở Việt Nam bằng phương pháp HPLC-UV

Lê Minh Hà<sup>1</sup>, Đỗ Thị Thanh Huyền<sup>1</sup>, Ngô Thị Phương<sup>1</sup>, Lê Văn Nhân<sup>2</sup>,  
Phương Anh Tuấn<sup>1</sup>, Trần Văn Thanh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

<sup>2</sup>Trung tâm nghiên cứu và chuyển giao công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

<sup>3</sup>Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, \*Email: halm2vn@gmail.com

## TÓM TẮT

3-O-caffeoyquinic acid (3-CQA) là hợp chất chlorogenic acid chính được tìm thấy trong hạt cà phê. Chlorogenic acid là nhóm chất được biết là sở hữu nhiều hoạt tính sinh học quý báu. Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo phương pháp định lượng 3-CQA trong hạt cà phê xanh ở Việt Nam sử dụng phương pháp HPLC. Phương pháp định lượng được xây dựng có độ lặp lại, độ chính xác và độ nhạy cao (giá trị LOD và LOQ của 3-CQA lần lượt là 0,027 và 0,091 ppm). Áp dụng phương pháp này để định lượng hợp chất 3-CQA trong một số loại cà phê xanh thu ở Việt Nam (tỉnh Gia Lai, Lâm Đồng) cho thấy hàm lượng 3-CQA nằm trong khoảng 2,01 – 2,90 % so với khối lượng mẫu khô. Đây là báo cáo đầu tiên ở Việt Nam về xác định hàm lượng hợp chất 3-CQA trong hạt cà phê xanh sử dụng phương pháp HPLC.

**Từ khóa:** hạt cà phê xanh, 3-O-caffeoyquinic acid, HPLC.

## ABSTRACT

3-O-caffeoyquinic acid (3-CQA) is the main chlorogenic acid found in coffee beans, which possesses a range of valuable bioactivities. In present paper, we report quantitative method of 3-CQA in green coffee beans of Vietnam using HPLC technique. The developed method was showed high repeatability, high

Ngày nhận bài: 10/8/2021

Ngày phản biện: 13/8/2021

Ngày chấp nhận đăng: 30/8/2021



accuracy and good sensitivity (LOD and LOQ of 3-CQA were 0.027 and 0.091 ppm, respectively). Applying this method for quantitative assay of 3-CQA in some types of green coffee beans collected in Vietnam (Gia Lai, Lam Dong provinces), the content of 3-CQA was determined from 2,01 – 2,90 % compared to dry sample weight.

## 1. MỞ ĐẦU

Chlorogenic acids (CGAs) là nhóm các hợp chất phenolic với 7 hợp chất chính (3-CQA, 5-CQA, 4-CQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA và 4,5-diCQA) được hình thành bởi sự ester hóa giữa các cinnamic acids như caffeic, ferulic, p-coumaric acids với (-)-quinic acid. Đây là các thành phần có hoạt tính sinh học chủ yếu trong hạt cà phê.[1] 3-O-caffeoyquinic acid (3-CQA) là hợp chất chlorogenic acid phổ biến nhất, có tác dụng chống oxi hóa, kháng khuẩn, bảo vệ gan, bảo vệ tim mạch, kháng viêm, giảm đau, bảo vệ thần kinh, chống tiểu đường, kháng virus, chống cao huyết áp. [2] Ngoài ra, trong bài báo đã công bố [3] chúng tôi đã phân lập và xác định cấu trúc hợp chất 3-CQA từ hạt cà phê xanh Arabica thu tại Lâm Đồng với hàm lượng cao. Mặc dù 3-CQA được biết là thành phần chính và đóng góp vào tác dụng của hạt cà phê xanh, nhưng ở Việt Nam, chưa thấy có công bố về phương pháp định lượng hợp chất này trong hạt cà phê xanh. Do đó, trong bài báo này, chúng tôi trình bày việc xây dựng phương pháp định lượng hợp chất 3-CQA trong hạt cà phê xanh bằng phương pháp HPLC đồng thời đánh giá hàm lượng của nó trong một số loại hạt cà phê xanh thu ở Việt Nam.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Nguyên liệu, hóa chất

Hạt cà phê xanh được thu mua ở các tỉnh Gia

### 2.2.1. Chuẩn bị mẫu

Bột mịn hạt cà phê xanh khô (50g) được ngâm chiết với hỗn hợp ethanol-nước (50:50, v:v) trong thiết bị chiết siêu âm gia nhiệt 3 lần, mỗi lần 3 giờ ở 50°C. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc và loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết methanol được dùng làm mẫu thử để xác định hàm lượng hợp chất 3-CQA.

1 mg mẫu thử được hòa tan trong hỗn hợp dung môi (10 mL formic acid (2%) + 50 mL ACN (10%) + nước khử ion (440 mL)) ở 50°C trong 15 phút sau đó lọc qua màng lọc 0,22 µm trước khi được bơm vào hệ thống HPLC.

### 2.2.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

Dung dịch chuẩn gốc 3-CQA nồng độ 1000 ppm (0,001g 3-CQA hòa tan trong 1 mL hỗn hợp dung môi như trên ở 50°C trong 15 phút) sau đó pha loãng tới các nồng độ 0,1 ppm, 0,2 ppm, 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm và 100 ppm.

### 2.2.3. Điều kiện định lượng

Sự định lượng được tiến hành trên hệ thống thiết bị HPLC Ultimate 30,000 LC (Thermo Fisher Scientific, Germany) với cột C18 (3 µm, 150 × 2.1 mm<sup>2</sup>) Hypersil GOLD aQ và detector UV-Vis. Dung môi pha động kênh A: dung dịch nước 0,1% TFA, kênh B: acetonitrile. Tốc độ dòng 0,5 mL/min. Nhiệt độ cột duy trì ở 25°C. Thể tích tiêm mẫu 10 µL. Detector được cài đặt ở bước sóng 330 nm.

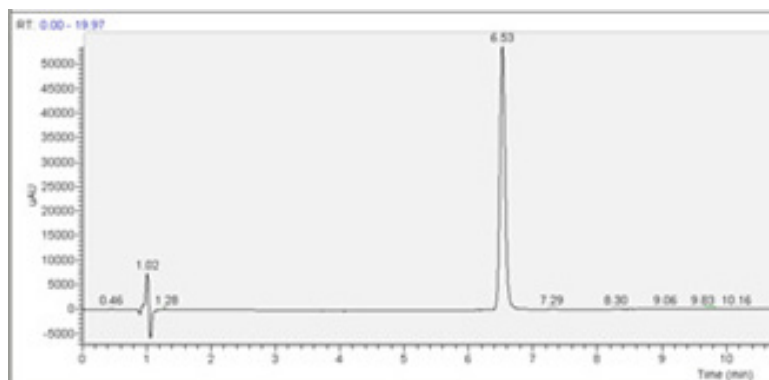


### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

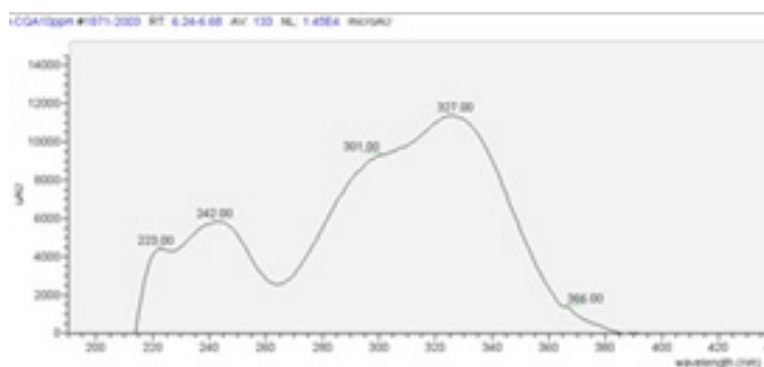
#### 3.1. Xây dựng đường chuẩn 3-CQA

3-CQA được phát hiện bởi detector UV-Vis/DAD ở bước sóng 330 nm (bước sóng này được

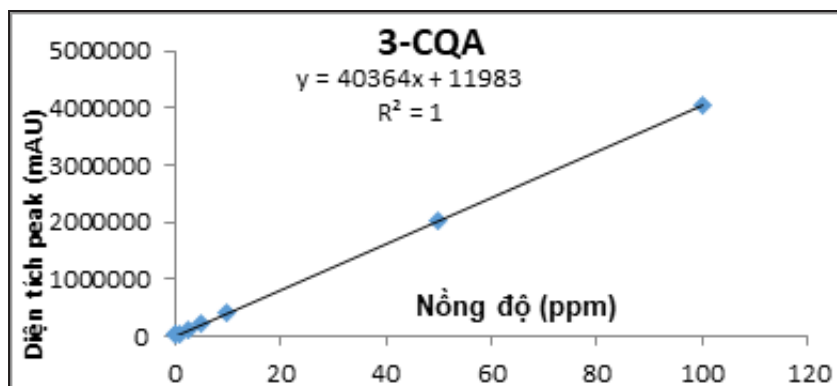
chọn thông qua thí nghiệm quét khoảng hấp thụ cực đại UV của 3-CQA kết hợp với các tài liệu tham khảo [4]. Pic tín hiệu của 3-CQA được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu Rt khoảng 6,5 phút (Hình 1).



Hình 1. Sắc kí đồ của chất chuẩn 3-CQA



Hình 2. Phổ UV của chất chuẩn 3-CQA



Hình 3. Đường chuẩn định lượng 3-CQA



Đường chuẩn định lượng 3-CQA được thiết lập dựa trên thang nồng độ 0,1-100 ppm, mỗi nồng độ được phân tích lặp lại 3 lần. Kết quả thu được đường thẳng qua gốc tọa độ có hệ số  $R^2 = 1$  chứng tỏ rằng các giá trị thông số của phương pháp mà chúng tôi đã lựa chọn cho hệ thống LC là phù hợp cho việc phân tích định lượng. Đường chuẩn được tính toán dựa trên diện tích pic tại thời gian lưu  $R_t$  của 3-CQA bằng phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm ChemStation for LC3D System.

### 3.2. Độ lặp lại và độ chính xác của phương pháp

Độ lặp lại của phương pháp được xác định trên mẫu chuẩn bằng cách phân tích mẫu chuẩn 6 lần liên tiếp, tính toán trên thời gian lưu và diện tích pic cho kết quả như bảng 1. Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với thời gian lưu và diện tích pic có độ lệch chuẩn tương đối lần lượt là 0,796% and 0,088%

**Bảng 1.** Độ lặp lại của phương pháp

TT	Nồng độ (ppm)	Diện tích pic				Thời gian lưu (phút)			
		S pic	Trung bình	SD	RSD (%)	RT	Trung bình	SD	RSD (%)
1	10	415.690	415.566,3	365,64	0,088	6,53	6,52	0,05	0,796
2	10	416.013				6,49			
3	10	415.548				6,50			
4	10	415.704				6,61			
5	10	415.535				6,54			
6	10	414.908				6,46			

Độ chính xác của phương pháp được xác định bằng cách đo diện tích pic của chất chuẩn ở cùng nồng độ 10 ppm trong 6 thí nghiệm lặp lại liên tiếp, sau đó tính toán nồng độ dựa vào đường chuẩn. Độ lệch chuẩn và độ lệch chuẩn tương đối phản ánh độ

chính xác củ phương pháp phân tích (Bảng 2). Kết quả cho thấy phương pháp có độ chính xác cao với độ lệch chuẩn và độ lệch chuẩn tương đối tương ứng là 0,098 và 0,98%.

**Bảng 2.** Độ chính xác của phương pháp

TT	Nồng độ ban đầu (ppm)	Nồng độ phát hiện (ppm)	Giá trị trung bình (ppm)	SD (ppm)	RSD (%)
1	10	9,87	9,97	0,098	0,98
2	10	10,05			
3	10	9,85			
4	10	9,98			
5	10	10,10			
6	10	9,97			

### 3.3. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định dựa vào đường chuẩn.

Giới hạn phát hiện LOD được tính toán theo công thức  $3*SD/a$ , trong đó SD độ lệch chuẩn, a độ dốc của đường chuẩn. Giới hạn định lượng LOQ được tính toán theo công thức  $10*SD/a$ . Kết quả



cho thấy giá trị LOD và LOQ của 3-CQA được xác định lần lượt là 0,027 và 0,091 ppm.

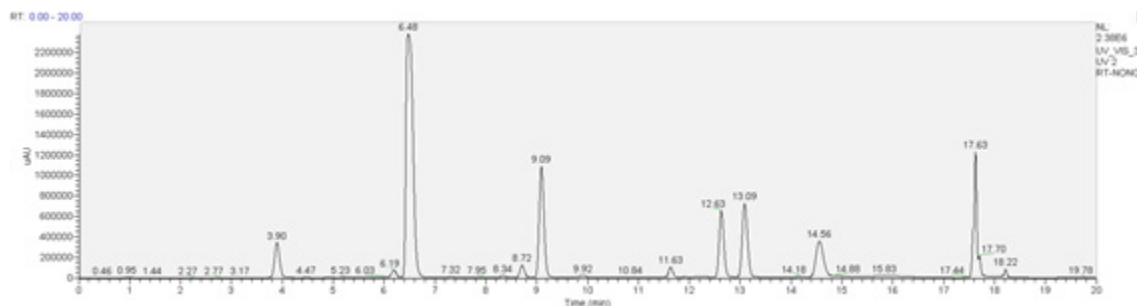
### 3.4. Áp dụng xác định hàm lượng 3-CQA trong hạt cà phê xanh

Tám mẫu hạt cà phê xanh được thu ở tỉnh Gia Lai, Kon tum được xác định hàm lượng 3-CQA

theo phương pháp đã mô tả ở trên. Kết quả cho thấy hàm lượng 3-CQA trong loài *Coffea robusta* (2,59 – 2,90%) cao hơn so với *Coffea arabica* (2,01 – 2,18%) (Bảng 3). Số liệu thu được tương đối phù hợp so với kết quả hàm lượng 3-CQA trong hạt cà phê xanh ở một số nơi trên thế giới. [4]

**Bảng 3.** Hàm lượng 3-CQA trong hạt cà phê xanh phân tích

TT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm	Tên khoa học	Hàm lượng 3-CQA trong cặn chiết (%)	Hiệu suất chiết (%)	Hàm lượng 3-CQA trong hạt cà phê xanh khô (%)
1	A-GL	Pleiku-Gia Lai	<i>C. robusta</i>	12,32	23,62	2,90
2	B-GL	Chư Sê-Gia Lai	<i>C. robusta</i>	11,80	24,05	2,84
3	A-LĐ	Đi Linh-Lâm Đồng	<i>C. robusta</i>	13,00	21,62	2,81
4	B-LĐ	Bảo Lâm-Lâm Đồng	<i>C. robusta</i>	11,70	22,18	2,59
5	C-GL	Dức Cơ-Gia Lai	<i>C. arabica</i>	9,63	22,56	2,17
6	D-GL	Chư Prong-Gia Lai	<i>C. arabica</i>	9,21	23,68	2,18
7	C-LĐ	Đà Lạt-Lâm Đồng	<i>C. arabica</i>	8,85	22,78	2,01
8	D-LĐ	Lạc Dương-Lâm Đồng	<i>C. arabica</i>	8,96	22,55	2,02



**Hình 4.** Sắc ký đồ HPLC của mẫu phân tích A-LĐ



#### 4. KẾT LUẬN

Đây là lần đầu tiên phương pháp định lượng hợp chất 3-CQA trong hạt cà phê xanh bằng HPLC ở Việt Nam được công bố. Phương pháp có độ lặp lại, độ chính xác cao, độ nhạy tốt với giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 0,027 và 0,091 ppm. Do vậy phương pháp có thể áp dụng để đánh giá hàm lượng 3-CQA trong hạt cà phê xanh, cà phê đã chế biến và các sản phẩm khác từ hạt cà phê nhằm đánh giá chất lượng của chúng. Kết quả định lượng 3-CQA trong tám mẫu hạt cà phê xanh

thu ở Việt Nam cho thấy hàm lượng 3-CQA trong *Coffea robusta* cao hơn *Coffea Arabica*. Các giá trị này dao động trong khoảng 2,01 đến 2,90% so với khối lượng mẫu hạt cà phê xanh khô.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hỗ trợ tài chính bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam thông qua đề tài mã số ĐL0000.02/20-21 và đề tài hỗ trợ nghiên cứu viên cao cấp mã số NVCC07.04 / 21-21.

---

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Adriana F., Mariana M., Carmen M.D., Sophie L.**- Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans, *The Journal of Nutrition: Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms* **138** (12) (2008) 2309-2315.
2. **Muhammad N., Veghar H., Muhammad A., Asghar A. K., Ghulam J. K., Muhammad S. et al.** - Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research, *Biomedicine & Pharmacotherapy* **97** (2018) 67-74.
3. **Huyen D. T. T., Phuong N. T., Tung C. S., Hung L. N., Tuan P. A., Anh N. T., Ha L. M.** – Chlorogenic acids from green coffee beans collected in Tay Nguyen provinces of Vietnam, *Vietnam Journal of Science and Technology*, **58** (6A) (2020) 10-16.
- 4 **Marzieh M., Lígia L., Arminda A.,** - Quantification of Caffeoylquinic Acids in Coffee Brews by HPLC-DAD, *Journal of Analytical Methods in Chemistry* (2014) 1-10 ID 965353.