



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027954

(51)⁷ C07H 15/04; A23F 5/10; A23L 1/221

(13) B

(21) 1-2016-01342

(22) 03/10/2014

(86) PCT/JP2014/076522 03/10/2014

(87) WO/2015/050240 09/04/2015

(30) 2013-208667 03/10/2013 JP

(45) 25/04/2021 397

(43) 27/06/2016 339A

(73) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japan

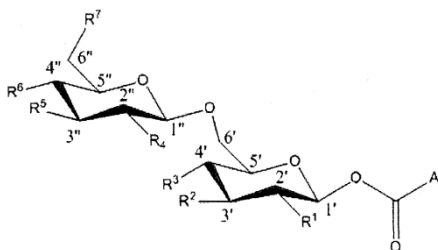
(72) NAKAHARA, Koichi (JP); IWASA, Keiko (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT GLYCOSIT AXIT HỮU CƠ CÓ TRONG HẠT CÀ PHÊ VÀ
PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG HẠT CÀ PHÊ

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất glycosit axit hữu cơ có trong các hạt cà phê và chế phẩm chứa hợp chất này.

[Công thức 1]



trong đó, mỗi trong số các gốc R₁ đến R₇ độc lập được chọn từ nhóm gồm H, OH, NH₂, OCH₃, OC(O)CH₃, và NHCOCH₃;

A được chọn từ C₁ đến C₆ alkyl hoặc C₁ đến C₆ alkenyl, và C₁ đến C₆ alkyl hoặc C₁ đến C₆ alkenyl này có thể được thế bằng methyl hoặc etyl.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất glycosit axit hữu cơ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thành phần thơm dễ bay hơi trong cà phê luôn nhận được sự quan tâm lớn. Đã được báo cáo rằng một phần của các thành phần thơm bay hơi này có mặt trong quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh ở dạng glycosit liên kết với đường. Vì glycosit là tiền thân của các chất thơm nên thành phần thơm dễ bay hơi này sẽ được giải phóng để tạo ra hương thơm khi chín hoặc khi có tổn thương về mặt vật lý. Đã có các báo cáo cho rằng glycosit trong quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh là tiền thân của các chất thơm, nhưng đa số các báo cáo này tập trung vào glycosit có hợp chất monoterpen hoặc diterpen ở dạng các aglycon. Tài liệu không phải sáng chế 1 bộc lộ rằng 3(S)-linalool-3-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-apiofuranosit và 3(S)-linalool-3-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-arabinofuranosit có trong hạt cà phê xanh ở dạng tiền thân của các chất thơm monoterpen. Ngoài ra, tài liệu không phải sáng chế 2 và 3 bộc lộ rằng 3'-O- β -D-glucopyranosyl-2'-O-isovaleryl-2-O- β -D-glucopyranosyl-atractylogenin, 2-O- β -D-glucopyranosyl-atractylogenin, và 2'-O-isovaleryl- β -D-glucopyranosyl-atractylogenin có trong hạt cà phê ở dạng tiền thân của các chất thơm diterpen hoặc tiền thân của các chất thơm axit isovaleric. Cũng được báo cáo rằng glycosit có metyl axit crotonic hoặc axit isovaleric ở dạng aglycon có mặt trong quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh (Tài liệu không phải sáng chế 4). Tài liệu không phải sáng chế 4 bộc lộ 3-metylbutanoyl-1-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-apiofuranosit, 3-metylbutanoyl-6-O- α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosit, và 3-metylbut-2-enoyl-1-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-apiofuranosit.

Danh sách tài liệu trích dẫn

Tài liệu không phải sáng chế

Tài liệu không phải sáng chế 1: B. Weckerle, G.Toth, P.Schreire, Eur Food Res Technol (2003) 216:6-10

Tài liệu không phải sáng chế 2: Hans Gerhard Maier, Helga Wewetzer, Z. Lebensm. Unters. Forsch, 167, 105-107 (1978)

Tài liệu không phải sáng chế 3: Bradbury A.G.W., Balzer H.H., Colloq. 18th Sci.

Int. Cafe, (1999) 71-77

Tài liệu không phải sáng chế 4: Bernhard Weckerle, Tamas Gati, Gabor Toth, Peter Schreier, *Phytochemistry* 60 (2002) 409-414

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Tuy nhiên, sự có mặt của các glycosit có metyl axit crotonic hoặc axit isovaleric ở dạng các aglycon trong quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh là chưa biết ngoại trừ các bọc lộ trong Tài liệu không phải sáng chế 2, 3 và 4. Mục đích của sáng chế là đề xuất glycosit axit hữu cơ mới có trong cà phê và sử dụng nó.

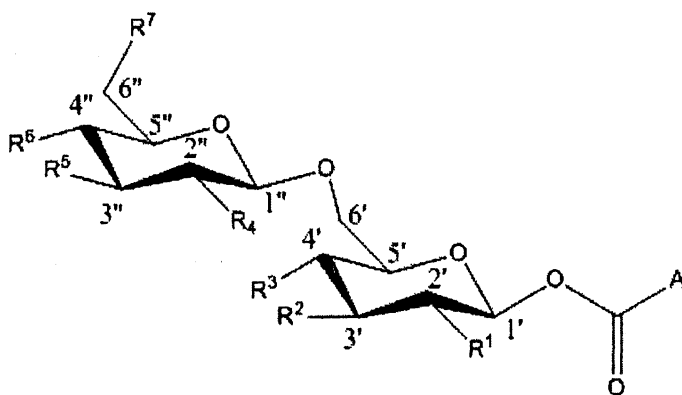
Giải quyết vấn đề

Để giải quyết vấn đề nêu trên, các tác giả đã bắt đầu các nghiên cứu về cà phê được cho điểm cao về hương vị khi đánh giá cảm quan. Bất ngờ là, sau các nghiên cứu chuyên sâu, các tác giả đã tìm ra glycosit chưa biết đến có mặt trong các hạt cà phê chất lượng cao. Các tác giả sáng chế đã hoàn thiện sáng chế dựa trên phát hiện này.

Sáng chế đề cập đến các đối tượng sau mà không bị giới hạn ở các đối tượng này.

(1) Hợp chất có cấu trúc được biểu diễn bằng công thức 1:

[Công thức 1]



trong đó, mỗi trong số các gốc R^1 đến R^7 độc lập được chọn từ nhóm gồm H, OH, NH_2 , OCH_3 , OC(O)CH_3 , và NHCOCH_3 ;

A được chọn từ C_1 đến C_6 alkyl hoặc C_1 đến C_6 alkenyl, và C_1 đến C_6 alkyl hoặc C_1 đến C_6 alkenyl có thể được thế bằng metyl hoặc etyl.

(2) Hợp chất theo (1), trong đó R^1 đến R^7 là OH; và

A được chọn từ nhóm gồm methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, etenyl, propenyl, butenyl, và pentenyl, và ethyl, propyl, butyl, pentyl, propenyl, butenyl, và pentenyl có thể được thế bằng methyl hoặc ethyl.

(3) Hợp chất theo (1) hoặc (2), trong đó A là propyl hoặc propenyl, và propyl hoặc propenyl có thể được thế bằng methyl.

(4) Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) được chọn từ 3-methyl-2-butenoyl- β -gentiobiosit hoặc 3-methyl-butanoyl- β -gentiobiosit.

(5) Chế phẩm chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4).

(6) Chế phẩm theo mục (5) để sử dụng trong việc cải thiện hương vị của hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê.

(7) Chế phẩm theo mục (5) hoặc (6) được trộn với hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê.

(8) Phương pháp cải thiện hương vị của phần chiết thu được từ hạt cà phê, phương pháp này bao gồm bước:

trộn hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê với hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) hoặc chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (5) đến (7).

(9) Phương pháp đánh giá chất lượng hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê, phương pháp này bao gồm bước:

phát hiện hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) trong hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê.

(10) Phương pháp nhận biết hoặc ước lượng loại cà phê, phương pháp này bao gồm bước:

phát hiện hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) trong hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê.

Hiệu quả của sáng chế

Đã khẳng định được rằng glycosit axit hữu cơ được các tác giả sáng chế phát

hiện là mới, và chúng có thể được sử dụng để cải thiện hương vị của phần chiết thu được từ hạt cà phê. Cũng đã khẳng định được rằng hàm lượng các glycosit có mối tương quan với chất lượng của hạt cà phê xanh, và do đó glycosit có thể được sử dụng để ước lượng hoặc đánh giá chất lượng của hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê. Ngoài ra, cũng đã khẳng định được rằng hàm lượng các glycosit có mối tương quan với nhiều loại hạt cà phê xanh, và do đó nó có thể được dùng để nhận biết hoặc dự đoán loại cà phê từ các hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê. Các vấn đề này là không dự đoán được khi tham khảo tình trạng kỹ thuật.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sắc ký đồ LC-MS của phần chiết thu được từ hạt cà phê xanh. (a) mảng điốt quang (photodiode array - PDA); (b) sắc ký đồ ion tổng (total ion chromatogram - TIC) (chế độ ion dương); (c) sắc ký đồ ion tổng (chế độ ion âm); (d) sắc ký đồ ion tách có $m/z=489$; (e) sắc ký đồ ion tách có $m/z=471$. 5-CQA: axit 5-cafeoylquinic (axit clorogenic), FQA: axit feruloylquinic.

Fig. 2 thể hiện phương pháp phân tích đường được tạo ra từ quá trình thủy phân các glycosit từ (1) đến (3) bằng axit sử dụng LC-RI. Glc: D-glucoza (thời gian lưu: khoảng 9,8 phút); Frc: D-fructoza (thời gian lưu: khoảng 13,5 phút); Gal: D-galactoza (thời gian lưu: khoảng 11,3 phút); Man: D-manoza (thời gian lưu: khoảng 12,6 phút).

Fig. 3 thể hiện thành phần dễ bay hơi phát hiện được bằng quá trình xử lý nhiệt các glycosit từ (1) đến (3). (a) Sắc ký đồ ion tổng của thành phần dễ bay hơi phát hiện được bằng quá trình xử lý nhiệt glycosit (1), và (b) phổ khối lượng của thành phần dễ bay hơi phát hiện được ở thời gian lưu 33,38 phút. (c) Sắc ký đồ ion tổng của thành phần dễ bay hơi phát hiện được bằng quá trình xử lý nhiệt glycosit (2), và (d) phổ khối lượng của thành phần dễ bay hơi phát hiện được ở thời gian lưu 29,00 phút. (e) Sắc ký đồ của thành phần dễ bay hơi phát hiện được bằng quá trình xử lý nhiệt glycosit (3), và (f) khối phổ của thành phần dễ bay hơi phát hiện được ở thời gian lưu 29,00 phút.

Fig. 4 thể hiện ảnh hưởng của methyl axit crotonic được tạo ra từ glycosit (1) và axit isovaleric được tạo ra từ glycosit (2) đến hương vị cà phê. Các điểm cảm quan trong biểu đồ là các giá trị trung bình.

Fig. 5 thể hiện mối quan hệ giữa hàm lượng của glycosit trong hạt cà phê xanh

với chất lượng cà phê. Glycosit (1) được phát hiện bằng sắc ký ion tách có $m/z = 469$, và glycosit (2) và (3) được phát hiện bằng sắc ký ion tách có $m/z = 471$.

Fig. 6 thể hiện mối quan hệ giữa điểm đánh giá cảm quan với glycosit axit hữu cơ, đối với hạt cà phê xanh. A: glycosit (1); B: glycosit (2); C: glycosit (3). Các phép đo được tiến hành ở $N=3$.

Fig. 7 thể hiện mối quan hệ giữa hàm lượng glycosit trong hạt cà phê xanh với các loại cà phê. 1: Guatemala Pacamala; 2: Guatemala SHB; 3: Jamaica Typica; 4: Brazil 4/5; 5: Việt Nam G1.

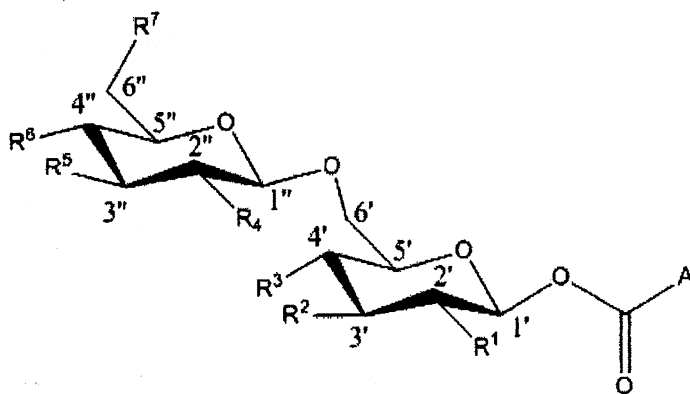
Fig. 8 thể hiện lượng các glycosit trong thịt quả và vỏ quả của quả cà phê. Glycosit (1) được phát hiện bằng sắc ký ion tách có $m/z = 469$, và các glycosit (2) và (3) được phát hiện bằng sắc ký ion tách có $m/z = 471$.

Mô tả chi tiết sáng chế

Glycosit mới

Sáng chế đề cập đến hợp chất. Hợp chất này là glycosit mới có cấu trúc được biểu diễn bởi công thức sau:

[Công thức 2]



Trong đó, mỗi trong số các gốc từ R^1 đến R^7 độc lập được chọn từ nhóm gồm H, OH, NH_2 , OCH_3 , $OC(O)CH_3$, và $NHCOCH_3$. Ví dụ, tốt hơn là, mỗi trong số các gốc từ R^1 đến R^7 độc lập được chọn từ H, OH, NH_2 , OCH_3 và $OC(O)CH_3$, và tốt hơn nữa là, độc lập được chọn từ OH. A được chọn từ C_1 đến C_6 alkyl hoặc C_1 đến C_6 alkenyl, trong đó C_1 đến C_6 alkyl hoặc C_1 đến C_6 alkenyl có thể được thế bằng methyl

hoặc etyl. C_1 đến C_6 alkyl là, ví dụ, metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl, hoặc hexyl, tốt hơn nếu là etyl, propyl, hoặc butyl, tốt hơn nữa là propyl, hoặc butyl, và thậm chí tốt hơn nữa là propyl, mà có thể được thế bằng metyl hoặc etyl; mỗi trong số C_1 đến C_6 alkenyl là, ví dụ, etenyl, propenyl, butenyl, pentenyl hoặc hexenyl, tốt hơn nếu là etenyl, propenyl, hoặc butenyl, tốt hơn nữa là propenyl, hoặc butenyl, và thậm chí tốt hơn nữa là propenyl, mà có thể được thế bằng metyl hoặc etyl. Trong bản mô tả, hợp chất theo sáng chế và glycosit theo sáng chế có cùng định nghĩa, và chúng được coi là các thuật ngữ có thể thay thế lẫn nhau.

Phương án về hợp chất theo sáng chế là, ví dụ, hợp chất trong đó mỗi trong số các gốc từ R^1 đến R^7 là OH, và A là propyl hoặc propenyl mà có thể được thế bằng metyl. Các ví dụ cụ thể về hợp chất theo sáng chế bao gồm 3-metyl-2-butenoyl- β -gentiobiosit (còn được gọi là metyl crotonyl gentiobiosit) hoặc 3-metyl-butanoyl- β -gentiobiosit (còn được gọi là isovaleryl gentiobiosit).

Glycosit gồm aglycon và glycon. Ví dụ, metyl crotonyl gentiobiosit bao gồm metyl axit crotonic ở dạng aglycon và gentiobiose ở dạng glycon, trong đó metyl axit crotonic và gentiobiose được liên kết qua liên kết este. Theo ví dụ khác, isovaleryl gentiobiosit bao gồm axit isovaleric ở dạng aglycon và gentiobiose ở dạng glycon, trong đó axit isovaleric và gentiobiose được liên kết qua liên kết este. Hai glycosit này không bay hơi, nhưng khi aglycon và glycon bị cắt đứt, metyl axit crotonic và axit isovaleric bay hơi lần lượt được giải phóng. Metyl axit crotonic và axit isovaleric là các thành phần của tinh dầu thực vật. Do đó, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng làm tiền thân của các chất thơm.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sản xuất bởi quy trình tổng hợp hóa học bằng cách sử dụng phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoặc nó có thể được sản xuất bằng cách chiết từ nguồn tự nhiên. Khi sản xuất hợp chất theo sáng chế từ nguồn tự nhiên, có thể sử dụng cây làm nguyên liệu khởi đầu. Cây có thể được sử dụng bao gồm các cây chi *Coffea*, như *Coffea arabica*, *Coffea canephora* var. *robusta*, *Coffea liberica*. Khi sản xuất hợp chất theo sáng chế từ *Coffea*, có thể sử dụng quả từ *Coffea* hoặc hạt cà phê xanh từ quả này. Hạt cà phê xanh được sử dụng trong bản mô tả là hạt thu được bằng cách sấy khô quả cà phê dưới ánh mặt trời sau đó đập lấy hạt, hoặc hạt thu được bằng cách lấy thịt

từ quả ra, sau đó rửa bằng nước, sấy khô và đập lấy hạt. Cũng có thể sản xuất hợp chất theo sáng chế từ vỏ quả hoặc thịt quả được lấy từ quả cà phê trong quá trình sản xuất hạt cà phê xanh. Vỏ quả và thịt quả thường bị vứt đi trong quá trình sản xuất hạt cà phê xanh. Do đó, nếu vỏ quả hoặc thịt quả được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu trong quá trình sản xuất hợp chất theo sáng chế, nó sẽ giúp sử dụng hiệu quả phế liệu.

Về mặt cải thiện hiệu quả sản xuất, ưu tiên sử dụng quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh có hàm lượng hợp chất mong muốn cao. Quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh này bao gồm quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh mà hương thơm của nó được đánh giá cao. Quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh này bao gồm, ví dụ, mocha, Blue mountain, geisha. Cũng có thể thực hiện đo sơ bộ hàm lượng hợp chất mong muốn trong quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh, và chọn quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh có hàm lượng hợp chất mong muốn cao.

Có thể sử dụng dung môi để chiết hợp chất theo sáng chế từ quả cà phê, hạt cà phê xanh hoặc vỏ quả hoặc thịt quả. Có thể sử dụng dung môi bất kỳ miễn là chiết được hợp chất theo sáng chế. Các ví dụ bao gồm dung dịch nước hoặc dung môi hữu cơ, cụ thể hơn là chất đệm hoặc rượu, mà có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp hai hoặc nhiều chất này. Rượu bán trên thị trường là thích hợp, và có thể sử dụng rượu thấp (metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, v.v.), rượu đa hóa trị dạng lỏng (rượu 1,3-butylen, glycol propylen, glyxerol, v.v.). Rượu thấp chứa nước và rượu thấp được ưu tiên theo sáng chế. Lượng dung môi cần sử dụng có thể thay đổi theo lượng nguyên liệu ban đầu được xử lý và hàm lượng hợp chất mong muốn trong hợp chất ban đầu. Ví dụ, 1 đến 1000 mL, tốt hơn là 1 đến 100 mL dung môi có thể được sử dụng trong 1 g nguyên liệu ban đầu.

Độ tinh khiết của hợp chất theo sáng chế được chiết từ nguyên liệu ban đầu có thể được tăng nếu cần. Độ tinh khiết có thể được tăng bằng cách tinh sạch phần chiết. Việc tinh sạch phần chiết có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, phương pháp sắc ký. Các ví dụ về phương pháp sắc ký bao gồm sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký ưa nước, sắc ký lọc gel. Độ tinh khiết có thể được đánh giá bằng sắc ký lỏng cao áp, hoặc LC-MS là sự kết hợp của sắc ký lỏng cao áp và đo khối phổ.

Cấu trúc hóa học của hợp chất theo sáng chế có thể được phân tích sử dụng

phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phân tích NMR và khối phổ.

Chế phẩm chứa glycosit mới

Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa hợp chất theo sáng chế. Do hợp chất theo sáng chế là glycosit, nó có thể được sử dụng làm tiền thân của chất thơm. Nói cách khác, thành phần thơm có thể được giải phóng bằng cách cắt liên kết giữa thành phần thơm và gốc đường trong hợp chất theo sáng chế. Phương pháp bất kỳ có thể được sử dụng để cắt liên kết giữa thành phần thơm và gốc đường trong hợp chất theo sáng chế. Phương pháp này bao gồm các phương pháp sử dụng axit, kiềm, nhiệt hoặc enzym. Enzym thủy phân có thể được sử dụng làm enzym để cắt liên kết giữa thành phần thơm và gốc đường. Các enzym thường có tính đặc hiệu với cơ chất cao, vì thế ưu tiên lựa chọn enzym phù hợp với glycosit để cắt hiệu quả liên kết. Các enzym có thể được sử dụng để cắt liên kết giữa thành phần thơm và gốc đường trong hợp chất theo sáng chế bao gồm các enzym có hoạt tính glucosidaza hoặc hoạt tính thủy phân glycosit.

Chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các thành phần khác. Các thành phần khác này bao gồm các thành phần được chấp thuận để dùng làm chất phụ gia thực phẩm, và các thành phần không được chấp thuận làm chất phụ gia thực phẩm nhưng được công nhận là an toàn khi đã được sử dụng trước đây. Các ví dụ bao gồm chất bảo quản, tá dược, chất tạo ngọt, chất điều chỉnh độ pH, v.v. Các ví dụ cụ thể về chất bảo quản bao gồm glyxin, natri axetat, natri benzoat và protamin. Các ví dụ cụ thể về tá dược bao gồm dextrin và tinh bột. Các ví dụ cụ thể về chất tạo ngọt bao gồm oligosacarit, glucoza, fructoza, stevia, aspartame, v.v. Các ví dụ cụ thể về chất điều chỉnh độ pH bao gồm axit phosphoric, axit xitric, axit clohydric, axit axetic, amoniac, axit cacbonic, axit lactic, v.v. Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm dextrin, oligosacarit hoặc axit xitric ngoài hợp chất theo sáng chế. Chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng bất kỳ. Ví dụ, nó có thể ở dạng bột, dạng lỏng, viên nén, hạt nhỏ, viên nang hoặc gel, v.v.

Lưu ý rằng hợp chất theo sáng chế có ở lượng từ 0,00000001 đến 0,00001% khối lượng trong quả/vỏ quả cà phê, và từ 0,00001 đến 0,1% khối lượng trong hạt cà phê xanh. Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa hợp chất theo sáng chế ở lượng giống như ở quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh. Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa hợp chất

theo sáng chế ở lượng khác lượng ở quả cà phê hoặc hạt cà phê xanh.

Cải thiện hương vị

Hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để cải thiện hương vị. Hương vị như được đề cập đến trong bản mô tả là hương vị thuần khiết, không có vị lạ với độ chua axit và độ ngọt được cân bằng. Việc cải thiện hương vị chỉ việc tạo ra hương vị được yêu thích hơn. Các ví dụ bao gồm làm tăng hương vị nguyên chất, bổ sung hương vị thiếu bằng cách tăng cường thành phần thơm cụ thể, hoặc thêm hương vị riêng. Hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể dùng cho thực phẩm thường là để cải thiện hương vị, và tốt hơn là có thể được dùng để cải thiện hương vị của cà phê, bia, rượu vang, whisky, v.v., và tốt hơn là có thể được dùng để cải thiện hương vị của cà phê. Khi được đề cập đơn giản là "cà phê" trong bản mô tả, thuật ngữ này bao gồm chung các sản phẩm và sản phẩm đã qua xử lý liên quan đến cà phê như quả cà phê, hạt cà phê xanh, hạt cà phê rang, phần chiết thu được từ quả cà phê, phần chiết thu được từ hạt cà phê xanh, và phần chiết thu được từ hạt cà phê rang. Ngoài ra, khi đề cập đến "hạt cà phê" trong bản mô tả, thuật ngữ này bao gồm quả cà phê, hạt cà phê xanh, hạt cà phê rang và các sản phẩm đã xay của nó, hạt *Coffea* và sản phẩm đã qua xử lý của nó.

Khi hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế được sử dụng để cải thiện hương vị của cà phê, nó có thể được sử dụng trong bước bất kỳ của quy trình sản xuất cà phê. Ví dụ, hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê có thể được trộn với hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế. Hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho rễ, thân cây, lá hoặc quả trước khi thu hoạch quả cà phê, nhờ đó làm tăng hàm lượng của hợp chất theo sáng chế trong quả cà phê.

Theo một phương án, sau khi hạt cà phê xanh và hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế được trộn cùng nhau, hạt cà phê xanh có thể được rang để cắt đứt các liên kết giữa thành phần thơm và gốc đường trong hợp chất theo sáng chế nhờ nhiệt của quá trình rang này, và nhờ đó giải phóng thành phần thơm. Do đó, hương thơm của hạt cà phê rang có thể được cải thiện. Theo phương án khác, hạt cà phê rang hoặc sản phẩm xay của nó được trộn với hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế, sau đó, rót nước nóng để cắt các liên kết giữa thành phần thơm và gốc đường trong hợp chất theo sáng chế bởi nhiệt của nước nóng, và nhờ đó giải phóng thành phần thơm để cải

thiện hương vị của phần chiết (còn được biết là cà phê nhỏ giọt) thu được từ hạt cà phê rang hoặc sản phẩm xay của nó. Theo ví dụ khác, phần chiết thu được từ hạt cà phê và hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được trộn, và sau đó hỗn hợp được gia nhiệt ở thời điểm thích hợp trước khi uống để phân cắt liên kết giữa thành phần thơm và gốc đường trong hợp chất theo sáng chế, sao cho hương thơm có thể được giải phóng ở thời điểm mong muốn. Khi sử dụng hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế để cải thiện hương vị, hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được trộn với đích của ứng dụng sao cho nồng độ của thành phần không mang hương là, ví dụ, từ 0,01 đến 100 ppb, tốt hơn là từ 0,1 đến 30 ppb, tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 10 ppb. Lưu ý rằng axit hữu cơ tự do có thể được lấy làm ví dụ về thành phần hương tự do, và metyl axit crotonic và axit isovaleric có thể được lấy làm ví dụ về axit hữu cơ tự do.

Đánh giá chất lượng cà phê

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để đánh giá chất lượng của cà phê. Các tác giả sáng chế là những người đầu tiên phát hiện ra rằng hợp chất theo sáng chế có trong hạt cà phê, và còn thấy rằng lượng hợp chất theo sáng chế có mối tương quan với chất lượng của cà phê. Tức là, được phát hiện thấy rằng cà phê có hàm lượng hợp chất theo sáng chế cao sẽ có chất lượng cao. Hợp chất theo sáng chế có thể là tiền thân của các chất thơm, vì vậy cà phê có hàm lượng hợp chất theo sáng chế cao sẽ giải phóng một lượng lớn thành phần thơm bởi quá trình xử lý nhiệt trong bước rang hoặc chiết, và do đó, được xem là góp phần làm nên chất lượng, mà không bị hạn chế ở đó. Việc đánh giá chất lượng bằng hợp chất theo sáng chế bao gồm bước chiết hợp chất theo sáng chế từ cà phê, phát hiện hợp chất, định lượng hợp chất, và sau đó so sánh giá trị định lượng với giá trị của mẫu đối chứng. Có thể thực hiện đánh giá chất lượng bằng cách sử dụng hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê, và ưu tiên sử dụng hạt cà phê xanh, hạt cà phê rang, sản phẩm xay của hạt cà phê rang, phần chiết thu được từ hạt cà phê xanh hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê rang, tốt hơn nữa là, hạt cà phê xanh hoặc hạt cà phê rang, và còn tốt hơn là, hạt cà phê xanh. Theo một phương án, có thể thực hiện đánh giá chất lượng bằng cách phát hiện hợp chất theo sáng chế trong hạt cà phê xanh, định lượng hợp chất, và so sánh với hạt cà phê xanh đối chứng có chất lượng trung bình. Theo phương án khác, hợp chất theo sáng chế được phát hiện và định lượng bằng cách lấy một phần hạt cà phê xanh đem đi đánh giá, trong khi hạt rang thu được từ phần còn lại của hạt cà phê xanh và được

phân mức theo điểm đánh giá cảm quan để xem xét mối liên quan giữa hợp chất theo sáng chế và hương vị của cà phê. "Điểm đánh giá cảm quan" là sự đánh giá hương vị theo quy trình của SCAA (Specialty Coffee Associate of America).

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có trong vỏ quả hoặc thịt của quả cà phê. Tương tự với hạt cà phê xanh, hàm lượng của hợp chất theo sáng chế trong vỏ quả hoặc thịt quả được xem là thay đổi tùy vào chất lượng của cà phê. Do đó, chất lượng cà phê có thể được đánh giá bằng cách sử dụng vỏ quả, thịt quả hoặc quả cà phê, cũng như bằng cách sử dụng hạt cà phê xanh. Có thể phân loại quả cà phê dựa vào hàm lượng của hợp chất theo sáng chế bằng cách đánh giá vỏ quả, thịt quả, quả cà phê hoặc phần chiết của nó, và nhờ đó có được hạt cà phê xanh được kiểm soát về chất lượng. Theo một phương án, quả cà phê có thể được phân loại bằng cách phát hiện và định lượng hợp chất theo sáng chế trong vỏ quả và/hoặc thịt quả, và bằng cách so sánh hàm lượng của hợp chất theo sáng chế với hàm lượng của hợp chất này trong vỏ quả và/hoặc thịt quả đối chứng có chất lượng trung bình.

Nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê. Thường khó để phân biệt loại cà phê từ vẻ bề ngoài của nó. Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng hàm lượng hợp chất theo sáng chế trong hạt cà phê xanh khác nhau tùy theo loại cà phê. Nói cách khác, hàm lượng hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng làm chỉ số để nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê. Phương pháp nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê bao gồm bước chiết, phát hiện hoặc định lượng hợp chất theo sáng chế từ cà phê, và sau đó, đối chiếu với tập hợp giá trị chuẩn cho từng loại. Ví dụ, khi lượng đã được định lượng trong mẫu cà phê nằm trong hoặc gần khoảng giá trị chuẩn của một loại cụ thể, có thể nhận biết hoặc đánh giá rằng loại của mẫu cà phê là loại cụ thể đó.

Ngoài ra, việc nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê có thể được thực hiện bằng hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê. Ví dụ, có thể nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê bằng cách chiết hợp chất theo sáng chế từ hạt cà phê rang, phần chiết thu được từ hạt cà phê xanh hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê rang, phát hiện và định lượng hợp chất, và đối chiếu với tập hợp giá trị chuẩn của từng loại.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có trong vỏ quả hoặc thịt của quả cà phê. Hàm

lượng của hợp chất theo sáng chế trong vỏ quả hoặc thịt quả có thể khác tùy theo chất lượng cà phê, tương tự với trường hợp ở hạt cà phê xanh. Do đó, có thể nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê bằng cách sử dụng vỏ quả, thịt quả hoặc quả cà phê, tương tự với trường hợp ở hạt cà phê xanh. Có thể nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê bằng cách chiết hợp chất theo sáng chế từ vỏ quả, thịt quả hoặc quả cà phê, phát hiện và định lượng hợp chất, và đối chiếu với tập hợp giá trị chuẩn cho từng loại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dựa vào các ví dụ được đưa ra dưới đây. Được hiểu rằng các ví dụ này không được dự định để giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1. Sàng lọc hợp chất mới

Tinh sạch hợp chất

Sau khi làm đông lạnh 1,6 kg hạt cà phê xanh (Pacamala) bằng nitơ lỏng, hạt cà phê được xay bằng máy nghiền hạt, và hạt cà phê xanh đã xay được xử lý bằng 5L hexan để loại bỏ thành phần ưa béo. Hạt xay sau khi xử lý bằng hexan được chiết bằng cách sử dụng 8L metanol 70% (80°C, 2 giờ), và lọc phần thu được bằng cách sử dụng diatômít. Phần còn lại được chiết bằng cách sử dụng 4L metanol 70%, và lọc phần thu được. Dịch lọc thu được được kết hợp với nhau và hỗn hợp được cô đến thể tích bằng 1/6 thể tích ban đầu. Bước cô này được thực hiện bằng thiết bị làm bay hơi quay. Ngoài ra, một phần của hỗn hợp được đưa qua LC-MS để phân tích thành phần trong các hỗn hợp (Fig. 1). Thực hiện đo khối phổ độ phân giải cao bằng LC-MS sử dụng Q-Exactive (được Thermo Fisher Scientific Inc. sản xuất) ở các điều kiện dưới đây.

Cột: KINETEX C18 (2,1 mm×250 mm, 1,7 µm, Phenomenex, CA)

Nhiệt độ cột: 40°C

Pha động A: nước + axit formic 0,1%

Pha động B: axetonitril + axit formic 0,1%

Gradient nồng độ của pha động: Nồng độ của pha động B 5% (0 - 2 phút), 5→55% (2 - 7,5 phút), 55→100% (7,5 phút - 17 phút), 100% (17 phút - 23 phút), 100→5% (23 phút - 24 phút), 5% (24 phút - 32 phút)

Tốc độ dòng trong cột: 0,2 mL/phút

Phương pháp ion hóa: ESI, chế độ ion dương, chế độ ion âm

Điện áp phun: 3,5 kV

Nhiệt độ mao quản: 250°C

Điện áp mao quản: 49V

Độ phân giải: 70000 (MS, MSMS)

Phạm vi quét MS: m/z 80 - 1200

Năng lượng va chạm: 15-45% chuẩn hóa

Kết quả là, đã chứng minh được sự có mặt của các hợp chất có m/z 469 (Fig. 1(d)) và m/z 471 (Fig. 1(e)) ở dạng các ion chọn lọc đặc trưng, cụ thể là hợp chất (1) (m/z 469), hợp chất (2) (m/z 471) và hợp chất (3) (m/z 471).

Dịch lọc cô đặc được nạp vào 1L nhựa hấp phụ HP-20 (Mitsubishi Chemical Co.). Nhựa này được rửa bằng 3L nước, sau đó, thực hiện rửa giải bằng cách nạp 3L etanol 10%, và 3L etanol 20% theo từng bước một. Các phân đoạn thu được được đưa qua LC-MS để nhận biết phân đoạn chứa hợp chất đã rửa giải. Kết quả cho thấy rằng các hợp chất (1), (2) và (3) được rửa giải thành phân đoạn nước rửa và phân đoạn etanol 10%. Phân đoạn nước rửa có hàm lượng hợp chất cao hơn.

Phân đoạn nước rửa có hàm lượng hợp chất (1), (2) và (3) cao hơn được nạp vào 1,2 L nhựa hấp phụ COSMOSIL 18-OPN (cỡ hạt 140 μ m, được sản xuất bởi Nacalai tesque). Rửa nhựa này bằng 500 mL dung dịch axit formic 0,1%, sau đó nạp 3L dung dịch axit formic 0,1%, 2,5 L etanol 10% chứa dung dịch axit formic 0,1%, và 2,5 L etanol 50% chứa dung dịch axit formic 0,1% vào nhựa theo từng bước một để thực hiện rửa giải. Ba loại hợp chất được rửa giải thành phân đoạn do rửa giải bằng 3 L dung dịch axit formic 0,1% và phân đoạn do rửa giải bằng 2,5 L etanol 10% chứa dung dịch axit formic 0,1%.

Các phân đoạn này được nạp vào 500 mL nhựa hấp phụ COSMOSIL 75C18PREP (cỡ hạt 75 μ m, được sản xuất bởi Nacalai tesque). Nhựa này được rửa bằng 500 mL dung dịch axit formic 0,1%, sau đó nạp 2L dung dịch axit formic 0,1%, 2,5 L etanol 10% chứa dung dịch axit formic 0,1%, và 2,5 L etanol 20% chứa

dung dịch axit formic 0,1% vào nhựa theo từng bước một để thực hiện rửa giải. Ba loại hợp chất được rửa giải thành phân đoạn do rửa giải bằng 2L dung dịch axit formic 0,1% và phân đoạn do rửa giải bằng 2,5 L etanol 10% chứa dung dịch axit formic 0,1%.

Các phân đoạn này được tinh sạch bằng HPLC điều chế được thể hiện dưới đây. Cột được sử dụng là Develosil-C30-UG-5 (Nomura Chemical Co., Ltd.) 20 mm × 250 mm. Pha động được sử dụng là A: nước + axit formic 0,1%, và B: axetonitril 90% + axit formic 0,1%. Tốc độ dòng được đặt là 15 ml/phút, với B10% (0 - 14 phút), gradien tuyến tính là B10→B25% (14 - 34 phút), và sau đó B25% được duy trì trong 10 phút. Phân đoạn chứa hợp chất (1) và (2) được rửa giải ở 7 đến 10 phút và phân đoạn chứa hợp chất (3) được rửa giải ở 11 đến 15 phút được gom lại và lần lượt được sấy thăng hoa. Quá trình sắc ký được lặp lại 17 lần.

Sản phẩm sấy thăng hoa thu được được đưa lần lượt qua sắc ký lần nữa bằng cách sử dụng HPLC điều chế. Cột được sử dụng là Shodex Asahipak NH2P-20 20F (Showa Denko K.K.) 20 mm × 300 mm, và pha động được sử dụng là A: nước, và B: axetonitril 90%. Tốc độ dòng được đặt là 10 ml/phút. Thực hiện tinh sạch các phân đoạn chứa hợp chất (1) và (2) trong điều kiện: B100% (0 đến 12 phút), và gradien tuyến tính của B100→B40% (12 đến 90 phút). Phân đoạn chứa hợp chất (1) và (2), được rửa giải ở 26 đến 29 phút, được gom lại và được sấy thăng hoa. Quy trình sắc ký được lặp lại hai lần. Thực hiện tinh sạch các phân đoạn chứa hợp chất (3) trong điều kiện: B100% (0 đến 12 phút), và gradien tuyến tính của B100→B40% (12 đến 60 phút). Phân đoạn chứa hợp chất (3) được rửa giải ở 22 đến 25 phút được gom lại và được sấy thăng hoa. Quy trình sắc ký được lặp lại bốn lần.

Sản phẩm sấy thăng hoa thu được được đưa lần lượt qua sắc ký lần nữa bằng cách sử dụng HPLC điều chế. Develosil-C30-UG-5 (Nomura Chemical Co., Ltd.) 4,6 mm×150 mm được sử dụng với pha động A: nước + axit formic 0,1%, và B: axetonitril 90% + axit formic 0,1%. Tốc độ dòng được đặt là 1 ml/phút. Thực hiện rửa giải đẳng dòng với B10% (0 - 30 phút). Hợp chất (1) được rửa giải ở 7 đến 8 phút, hợp chất (2) được rửa giải ở 8 đến 9 phút, hợp chất (3) được rửa giải ở 9 đến 10 phút lần lượt được gom lại để sấy thăng hoa. Sau đó, hợp chất (1) (2,3 mg), hợp chất (2) (2,3 mg) và hợp chất (3) (6 mg) được dò. Khi độ tinh khiết của hợp chất (1) đến (3) được xác định bằng LC-MS, mỗi hợp chất được thấy là đã được tinh sạch ở mức độ cao.

Xác định cấu trúc hóa học

1. Phân tích bằng dữ liệu phổ của việc phân tích bằng dụng cụ

Các hợp chất đã tinh sạch (1) đến (3) được hòa tan trong DMSO-d₆. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H{¹³C}-HSQC, ¹H{¹³C}-HMBC, TOCSY, DQF-COSY, ¹H-NOESY và ¹H-ROESY được xác định bằng thiết bị NMR (phổ kế DMX-750) trong điều kiện nêu dưới đây.

[Bảng 1]

Chuyển dịch hóa học trong phổ ¹H NMR và ¹³C NMR của Hợp chất 1, 2 và 3 đo được trong DMSO-d₆

Vị trí	1		2		3	
	¹ H NMR	¹³ C NMR	¹ H NMR	¹³ C NMR	¹ H NMR	¹³ C NMR
Gốc axyl						
1	-	164,13	-	171,16	-	172,19
2	5,71 (s)	114,91	22,4 (d; 7,0)	42,29	2,2 (m)	42,33
3	-	154,19	2,01 (m)	24,83	1,99 (m)	25,02
4	1,91 (s)	26,9	0,92 (d; 6,7)	22,02	0,91 (d; 6,7)	22,03
5	2,13 (s)	20,02	0,92 (d;6,7)	22,02	0,91 (d;6,7)	22,03
Gốc glucoza						
1'	5,36 (d; 8,3)	93,48	5,36 (d; 8,2)	93,86	5,17 (d; 3,6)	91,38
2'	3,11 (m)	72,22	3,11 (m)	72,2	3,20 (m)	71,4
3'	3,23 (m)	70,26	3,23 (m)	76,33	3,48 (m)	72,55
4'	3,19 (m)	69,16	3,18 (m)	69,15	3,06 (m)	70,03
5'	3,39 (m)	76,13	3,41 (m)	76,15	3,90 (m)	69,87
6'a	3,98 (dd; 10,1, 1,0)	67,85	3,96 (dd; 11,3, 1,0)	67,77	4,24 (dd; 11,7, 1,3)	63,36
6'b	3,56 (dd; 10,1, 5,5)	-	3,58 (dd; 11,3, 5,5)	-	4,01 (dd; 6,0, 11,7)	-
Gốc glucoza				Gốc fructoza		
1''	4,16 (d; 7,9)	10,95	4,17 (d; 7,8)	102,94	-	62,03
1ab'	-	-	-	-	3,38 (m)	-
2''	2,96 (m)	73,32	2,95 (m)	73,34	-	103,79
3''	3,11 (m)	76,62	3,11 (m)	76,6	3,87 (d; 8,1)	76,79
4''	3,04 (m)	69,84	3,04 (m)	69,85	3,73 (m)	74,39
5''	3,04 (m)	76,74	3,04 (m)	76,74	3,59 (m)	82,65
6''a	3,65 (dd; 11,2, 5,9)	60,86	3,65(dd; 11,2, 5,9)	60,89	3,57 (m)	62,50
6''b	3,43 (m)	-	3,44 (m)	-	3,34(m)	-
Nhóm đường OH-						
2'(OH)	5,25 (d; 5,5)	-	5,24 (d; 5,5)	-	5,13 (d; 6,0)	-
3'(OH)	5,15 (d; 4,8)	-	5,14 (d; 4,9)	-	4,89 (d; 4,8)	-
4'(OH)	5,07 (d; 5,6)	-	5,07 (d; 5,7)	-	5,01 (d; 5,7)	-
1''(OH)	-	-	-	-	4,81 (t; 6,2)	-
2''(OH)	4,83 (d; 4,8)	-	4,82 (d; 4,8)	-	-	-
3''(OH)	4,90 (d; 4,9)	-	4,90 (d; 4,9)	-	4,56 (d; 8,0)	-
4''(OH)	4,87 (d; 4,6)	-	4,87 (d; 4,5)	-	5,16 (d; 3,6)	-
6''(OH)	4,45 (t; 5,9, 5,9)	-	4,44 (t; 5,9, 5,9)	-	4,40 (t; 5,0, 5,0)	-

Trong phân tích $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ -HMBC, đỉnh ngang đối với các glycosit từ (1) đến (3) được quan sát như sau: đối với glycosit (1), glucoza H-1' ($\delta 5,36$)→nhóm axyl của cacbonyl cacbon ($\delta 164,13$), và glucoza H-1'' ($\delta 4,16$)→glucoza C-6' ($\delta 67,85$); đối với glycosit (2), glucoza H-1' ($\delta 5,36$)→nhóm axyl của cacbonyl cacbon ($\delta 171,16$), và glucoza H-1'' ($\delta 4,17$)→glucoza C-6' ($\delta 67,85$); và đối với glycosit (3), glucoza H-6a' ($\delta 4,01$) và glucoza H-6b' ($\delta 4,24$)→nhóm axyl của cacbonyl cacbon ($\delta 172,19$), và glucoza H-1' ($\delta 5,17$)→fructoza C-2'' ($\delta 103,79$).

Tiếp theo, hợp chất đã tinh sạch (1) đến (3) được chạy LC-Orbitrap-MS được đặt ở các điều kiện được chỉ ra dưới đây, và cấu trúc hóa học của chúng được xác định. Thực hiện đo khối phổ (ESI-MS) (Bảng 2) và phân tích các đoạn chính của khối phổ ESI (ESI-MS/MS) (Bảng 3) đối với các hợp chất (1) đến (3).

[Bảng 2]

Khối phổ của các hợp chất (1) đến (3)

	1	2	3
m/z (quan sát được)	469,1554	471,1710	471,1708
Chế phẩm	C ₁₈ H ₂₉ O ₁₄	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₄	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₄
Khối lượng	469,1557	471,1714	471,1714
Lý thuyết (ppm)	-0,64	-0,85	-1,06
Đương lượng RDB	4,5	4,5	4,5

[Bảng 3]

Đoạn chính của khối phổ ESI của các hợp chất (1) đến (3)

m/z	1	2	3
471,171		$[\text{M}+\text{HCO}_2\text{H}+\text{H}]^-$	$[\text{M}+\text{HCO}_2\text{H}+\text{H}]^-$
469,155	$[\text{M}+\text{HCO}_2\text{H}+\text{H}]^-$		
425,167		$[\text{M}-\text{H}]^-$	$[\text{M}-\text{H}]^-$
423,151	$[\text{M}-\text{H}]^-$		
323,098	$[\text{M}-\text{A}^a-\text{H}]^-$	$[\text{M}-\text{A}^a-\text{H}]^-$	$[\text{M}-\text{A}^a-\text{H}]^-$
179,056	$[\text{M}-\text{A}-(\text{Hexoza}-\text{H}_2\text{O})-\text{H}]^-$	$[\text{M}-\text{A}-(\text{Hexoza}-\text{H}_2\text{O})-\text{H}]^-$	$[\text{M}-\text{A}-(\text{Hexoza}-\text{H}_2\text{O})-\text{H}]^-$

^aA = gốc axyl (đối với hợp chất 1: axit 3-metylbut-2-enoic; hợp chất 2 và 3: axit 3-metylbutanoic)

2. Phân tích thành phần đường

Các glycosit từ (1) đến (3) được đem đi thủy phân bằng axit để phân tích thành phần đường. Các glycosit từ (1) đến (3) (200 μg mỗi glycosit) lần lượt được hòa tan

trong 0,2 mL HCl 6N, và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 100°C. Sau khi ủ, một phần dung dịch phản ứng được đem đi phân tích bằng cách sử dụng LC-RI ở các điều kiện dưới đây. Các đường chuẩn (D-glucoza, D-fructoza, D-galactoza, D-manoza) được cho phản ứng trong các điều kiện tương tự và được phân tích. Kết quả được thể hiện trên Fig. 2. Bằng cách so sánh thời gian lưu LC của các glycosit với thời gian lưu của đường chuẩn, khẳng định được rằng glycosit (1) và glycosit (2) bao gồm glucoza, và glycosit (3) bao gồm glucoza và fructoza.

Điều kiện của phân tích LC-RI:

- Cột: Cột Shodex SUGAR SP080 (300x0,8 mm, cỡ hạt 7 μ m)
- Nhiệt độ cột: 80°C
- Pha động: nước (đẳng dòng)
- Tốc độ dòng trong cột: 0,6 mL/phút

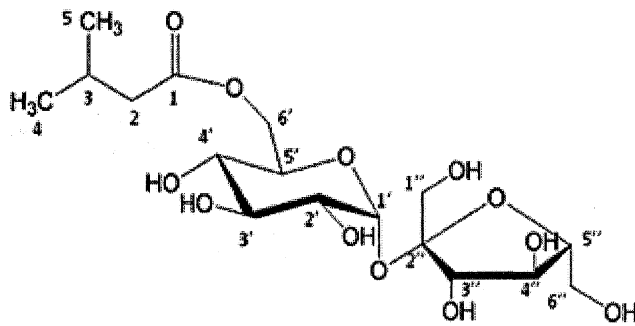
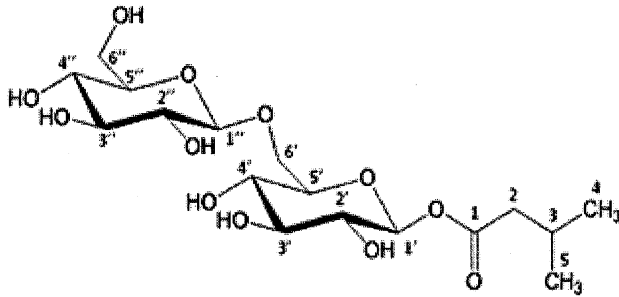
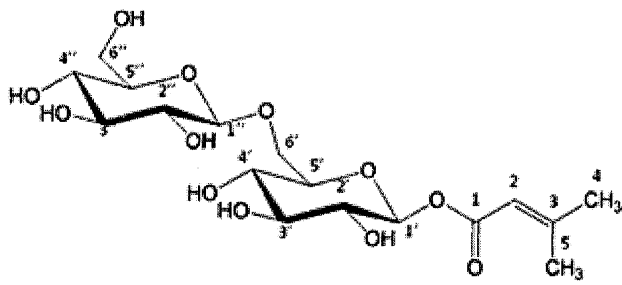
Việc phân tích các dữ liệu trên đây chỉ ra rằng các hợp chất (1) đến (3) lần lượt là các glycosit từ (1) đến (3) có các cấu trúc và tên hợp chất như sau.

Glycosit (1): 3-metyl-2-butenoyl- β -gentiobiosit

Glycosit (2): 3-metyl-butanoyl- β -gentiobiosit

Glycosit (3): 3-metyl-butanoyl-sucrosit

[Công thức 3]



Theo kết quả tra cứu cơ sở dữ liệu về hợp chất, các glycosit (1) và (2) được thấy là các hợp chất mới chưa được biết đến tại thời điểm này. Mặt khác, glycosit (3) được thấy là tương ứng với hợp chất được báo cáo trong Tài liệu không phải sáng chế 4. Lưu ý rằng các hợp chất (1) đến (3) lần lượt giống với các glycosit từ (1) đến (3), và chúng có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này.

Ví dụ 2. Cải thiện hương vị cà phê

Phản ứng nhiệt phân glycosit

Để dùng làm mẫu cho phản ứng nhiệt sinh ra từ bước rang hạt cà phê xanh, các glycosit từ (1) đến (3) đã tinh sạch bằng phương pháp từ Ví dụ 1 lần lượt được gia nhiệt bằng buồng nhiệt phân (200°C, 10 phút), và đưa đến GC-MS. Thực hiện GC-MS trong điều kiện sau.

- Thiết bị: Buồng nhiệt phân Double-shot Pyrolyzer (Pyolyzer) được sản xuất bởi Frontier Lab, 7890A (GC), 5975C (MS) bằng công nghệ Agilent
- Điều kiện nhiệt phân: 230°C, 10 phút.
- Cột: DB-WAXetr (60 m × 0,32 mm × 0,25 µm) được sản xuất bởi GESTEL
- Nhiệt độ cột: 40°C (2 phút) - 40°C/phút - 250°C (5 phút)
- Khí mang: He
- Dòng chuyển: 250°C
- Nhiệt độ nguồn ion: 230°C
- Thông số quét: $m/z = 33$ đến 450
- Tỷ lệ chia tách: 10:1

Kết quả được thể hiện trên Fig. 3. Khi gia nhiệt glycosit (1), hợp chất có thời gian lưu (RT) bằng 33,38 phút được phát hiện. Khi gia nhiệt glycosit (2), hợp chất có RT bằng 29,00 phút được phát hiện. Khi gia nhiệt glycosit (3), hợp chất có RT bằng 29,00 phút được phát hiện. Bằng cách thực hiện tra cứu thư viện khối phổ, hợp chất có RT bằng 33,38 phút được xác nhận là metyl axit crotonic, và hợp chất có RT bằng 29,00 phút được xác nhận là axit isovaleric.

Kết quả này gợi ý rằng các glycosit từ (1) đến (3) bị phân hủy bằng nhiệt phân trong quá trình rang hạt cà phê xanh, tạo ra metyl axit crotonic từ glycosit (1), axit isovaleric từ glycosit (2), và axit isovaleric từ glycosit (3).

Tác dụng cải thiện hương vị cà phê

Tác dụng của axit metyl crotonic thu được bằng cách gia nhiệt glycosit (1), và axit isovaleric thu được bằng cách gia nhiệt glycosit (2) lên hương vị cà phê được kiểm tra.

Sau khi xay 30 mL hạt cà phê Guatemalan rang có chất lượng trung bình, cho 300 mL nước nóng chảy nhỏ giọt vào hạt cà phê xay. Phần chiết cà phê thu được được sử dụng làm cà phê nhỏ giọt đối chứng. Cà phê nhỏ giọt này được trộn với metyl axit crotonic (10 ppb) và axit isovaleric (10 ppb) để thực hiện đánh giá hương vị bởi sáu người tham gia thẩm định.

Điểm cảm quan được tính cho độ chua axit, độ nguyên chất và độ đắng trong dư vị. Trong quá trình đánh giá hương vị, hai mẫu chuẩn được sử dụng: cà phê nhỏ giọt đối chứng (cà phê nhỏ giọt thu được từ hạt cà phê Guatemalan rang chất lượng trung bình); và cà phê nhỏ giọt thu được từ hạt cà phê rang được làm bằng cách rang hạt cà phê xanh có điểm hương vị cao, được sử dụng trong Ví dụ 3. Độ chua axit, độ sạch và độ đắng trong dư vị của cà phê nhỏ giọt đối chứng mỗi yếu tố được đánh giá là 3 điểm. Độ chua axit và độ sạch của cà phê nhỏ giọt thu được từ hạt cà phê xanh có điểm hương vị cao được đánh giá là 5 điểm, và độ đắng trong dư vị được đánh giá là 1 điểm.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 4. So sánh với cà phê nhỏ giọt đối chứng, cà phê nhỏ giọt được trộn với axit isovaleric và methyl axit crotonic có điểm về độ chua axit và độ sạch cao, và điểm độ đắng trong dư vị thấp.

Ngoài ra, những người tham gia thẩm định cho rằng axit isovaleric đã bổ sung cụ thể là độ chua axit hoa quả cho cà phê nhỏ giọt, và methyl axit crotonic làm tăng thêm độ dịu cho cà phê nhỏ giọt bằng cách làm giảm độ đắng trong dư vị. Các kết quả này chỉ rõ rằng hương vị của cà phê được cải thiện khi trộn methyl axit crotonic và axit isovaleric.

Ví dụ 3. Đánh giá chất lượng cà phê

Nghiên cứu được thực hiện để xem liệu các glycosit từ (1) đến (3) có thể được sử dụng để đánh giá chất lượng của cà phê hay không. Hàm lượng của các glycosit ở hạt cà phê xanh chất lượng cao được so sánh với hàm lượng các glycosit của hạt cà phê xanh chất lượng trung bình để xem liệu có mối tương quan giữa chất lượng hạt cà phê xanh với hàm lượng các glycosit hay không. Các hạt cà phê xanh sau đây được sử dụng để nghiên cứu.

- Hạt cà phê xanh chất lượng cao (hạt cà phê xanh có điểm hương vị cao): hạt cà phê xanh Jamaica Blue Mountain, loại bỏ các hạt hỏng, sàng 18.
- Hạt cà phê xanh chất lượng trung bình: hạt cà phê xanh Guatemalan, loại bỏ các hạt hỏng, sàng lọc 18.

Phân chiết thu được từ hạt cà phê xanh theo phương pháp được nêu trong Ví dụ 1, và thực hiện phân tích bằng cách phát hiện ion chọn lọc m/z 469, đặc trưng ở

glycosit (1), và ion chọn lọc m/z 471, đặc trưng ở glycosit (2) và (3), làm chỉ số.

Kết quả phân tích được thể hiện trên Fig. 5. Các vùng đỉnh của m/z 469 và m/z 471 ở hạt cà phê xanh chất lượng cao là cao hơn với hạt cà phê xanh chất lượng trung bình. Nói cách khác, hàm lượng các glycosit (1), glycosit (2) và glycosit (3) ở hạt cà phê xanh chất lượng cao được thấy là cao hơn so với hạt cà phê xanh chất lượng trung bình.

Do đó, được cho thấy rằng hàm lượng của một trong số các glycosit (1), glycosit (2) hoặc glycosit (3) có thể được sử dụng làm chỉ số để đánh giá chất lượng hạt cà phê xanh. Cũng được thấy rằng chất lượng hạt cà phê xanh có thể được đánh giá bằng cách sử dụng hàm lượng các glycosit (1) và (2), các glycosit (2) và (3), các glycosit (1) và (2) hoặc các glycosit từ (1) đến (3) làm chỉ số.

Ví dụ 4. Đánh giá chất lượng cà phê

Hạt cà phê xanh có các chất lượng khác nhau được so sánh để nghiên cứu mối tương quan giữa chất lượng hạt cà phê xanh với các glycosit từ (1) đến (3).

36 loại hạt cà phê xanh Guatemalan được chuẩn bị và một phần của mỗi loại hạt cà phê xanh Guatemalan được rang lên (giá trị L: 22-23), sau đó điểm đánh giá cảm quan được quy cho mỗi loại hạt cà phê xanh theo protocol SCAA (Specialty Coffee Associate of America – Hiệp hội cà phê đặc sản Hoa Kỳ). Ngoài ra, các phần còn lại của mỗi loại hạt cà phê xanh được làm đông bằng nitơ lỏng, và được xay bằng máy nghiền hạt, sau đó sản phẩm đã xay được xử lý với hexan. Sản phẩm xay đã được xử lý với hexan được xử lý bằng metanol 70% để thu được phân chiết. Phân chiết được đưa qua bộ LC-MS đến các điều kiện như sau. Phân chiết được xác định ở $N = 3$.

Thiết bị: LC-MS-IT-TOF (Shimadzu)

Cột: Luna-C18 (1,0 mm×250 mm, 5 μ m, được sản xuất bởi Phenomenex, CA)

Nhiệt độ cột: 40°C

Pha động A: nước + axit formic 0,1%

Pha động B: axetonitril + axit formic 0,1%

Gradient nồng độ của pha động: Nồng độ của pha động B 5% (0 - 2 phút), 5→55% (2 - 7,5 phút), 55→100% (7,5 phút - 17 phút), 100% (17 phút - 23 phút), 100→5% (23 phút

- 24 phút), 5% (24 phút - 32 phút)

Tốc độ dòng trong cột: 0,1 mL/phút

Phương pháp ion hóa: ESI, chế độ ion dương, chế độ ion âm

Điện áp phun: +4,5 kV (chế độ ion dương), -3,5 kV (chế độ ion âm)

Tốc độ dòng khí ống phun: 1,5 L/phút

Nhiệt độ CDL: 250°C

Nhiệt độ khối nhiệt (CDL): 250°C

Phạm vi quét MS: m/z 80 - 800

Ion chọn lọc m/z 447 (chế độ ion dương), đặc trưng ở glycosit (1), và ion chọn lọc m/z 449 (chế độ ion dương), đặc trưng ở các glycosit (2) và (3), được sử dụng làm chỉ số nhận biết các đỉnh tương ứng với các glycosit từ (1) đến (3) để xác định các vùng đỉnh của mỗi glycosit. Vùng đỉnh của mỗi glycosit được chuẩn hóa bằng tổng của toàn bộ lượng ion. Đồ thị liên quan đến điểm đánh giá cảm quan và vùng đỉnh chuẩn hóa được tạo ra cho mỗi trong số các glycosit từ (1) đến (3) (Fig. 6). Fig. 6 cho thấy rằng hạt chất lượng cao có xu hướng chứa các glycosit từ (1) đến (3) ở lượng cao. Theo ví dụ cụ thể, giá trị định lượng của các glycosit từ (1) đến (3) từ hạt cà phê xanh có điểm đánh giá cảm quan là 81 điểm là như sau. Glycosit (1): 0,017% khối lượng, glycosit (2): 0,018% khối lượng, glycosit (3): 0,019% khối lượng.

Kết quả trên đây cho thấy rằng có mối tương quan giữa vùng đỉnh của các glycosit từ (1) đến (3) với điểm đánh giá cảm quan. Nói cách khác, lượng có sẵn của các glycosit từ (1) đến (3) được sử dụng làm chỉ số để dự đoán chất lượng cà phê.

Ví dụ 5. Nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê

Được nghiên cứu là liệu có sự khác biệt hàm lượng các glycosit trong các loại cà phê khác nhau hay không. Các hạt cà phê xanh dưới đây được sử dụng. Các glycosit từ (1) đến (3) được chiết, được phát hiện và định lượng theo phương pháp từ Ví dụ 1.

[Bảng 4]

Số	Hạt cà phê xanh
1	Guatemala Pacamala
2	Guatemala SHB
3	Jamaica Typica
4	Brazil 4/5
5	Vietnam G1

Kết quả được thể hiện trên Fig. 7. Được cho thấy rằng hàm lượng các glycosit từ (1) đến (3) có sự khác biệt lớn giữa các loại khác nhau. Nói cách khác, được chỉ ra rằng hàm lượng glycosit (1), glycosit (2) hoặc glycosit (3) có thể được sử dụng làm chỉ số để nhận biết hoặc đánh giá loại hạt cà phê xanh. Ngoài ra, cũng được chỉ ra rằng có thể nhận biết hoặc đánh giá loại hạt cà phê xanh bằng cách kết hợp hàm lượng các glycosit (1) và (2), các glycosit (2) và (3), các glycosit (1) và (3) hoặc các glycosit từ (1) đến (3).

Ngoài ra, tỷ lệ giữa hàm lượng các glycosit từ (1) đến (3) được thấy là đặc trưng ở mỗi loại. Do đó, được chỉ ra rằng có thể nhận biết hoặc đánh giá loại hạt cà phê xanh bằng cách sử dụng tỷ lệ giữa hàm lượng các glycosit từ (1) đến (3) làm chỉ số.

Ví dụ 6. Glycosit axit hữu cơ trong thịt quả hoặc vỏ của quả cà phê

Ví dụ này được dự định để chiết glycosit axit hữu cơ từ thịt quả hoặc vỏ của quả cà phê, và để khẳng định sự có mặt của chúng.

Quả cà phê (loại: Red Catuai) được làm đông bằng nitơ lỏng, được tách riêng vỏ quả/thịt quả và hạt. Vỏ quả/thịt quả được xay bằng máy nghiền hạt để thu được phần chiết theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1. Thực hiện phân tích bằng cách đặt ion chọn lọc m/z 469, đặc trưng ở glycosit (1), và ion chọn lọc m/z 471, đặc trưng ở các glycosit (2) và (3), làm chỉ số (Fig. 8).

Kết quả này chỉ rõ rằng các glycosit từ (1) đến (3) cũng có trong vỏ quả/thịt quả. Điều này có nghĩa là vỏ quả/thịt quả có thể được sử dụng để chiết glycosit, thực hiện phân tích chất lượng cà phê, và nhận biết hoặc đánh giá loại cà phê.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất được chọn từ 3-metyl-2-butanoyl- β -gentiobiosit hoặc 3-metyl-butanoyl- β -gentiobiosit.
2. Chế phẩm chứa hợp chất theo điểm 1.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này còn chứa 3-metyl-butanoyl-sucrosit.
4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 3 được trộn với hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê.
5. Phương pháp cải thiện hương vị của phần chiết thu được từ hạt cà phê, phương pháp này bao gồm bước trộn hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê với hợp chất theo điểm 1 hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4.
6. Phương pháp đánh giá chất lượng hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê, phương pháp này bao gồm bước phát hiện hợp chất theo điểm 1 hoặc hợp chất 3-metyl-butanoyl-sucrosit có trong hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê.
7. Phương pháp nhận biết hoặc ước lượng loại cà phê, phương pháp này bao gồm bước phát hiện hợp chất theo điểm 1 hoặc hợp chất 3-metyl-butanoyl-sucrosit có trong các hạt cà phê hoặc phần chiết thu được từ hạt cà phê.

Fig. 1

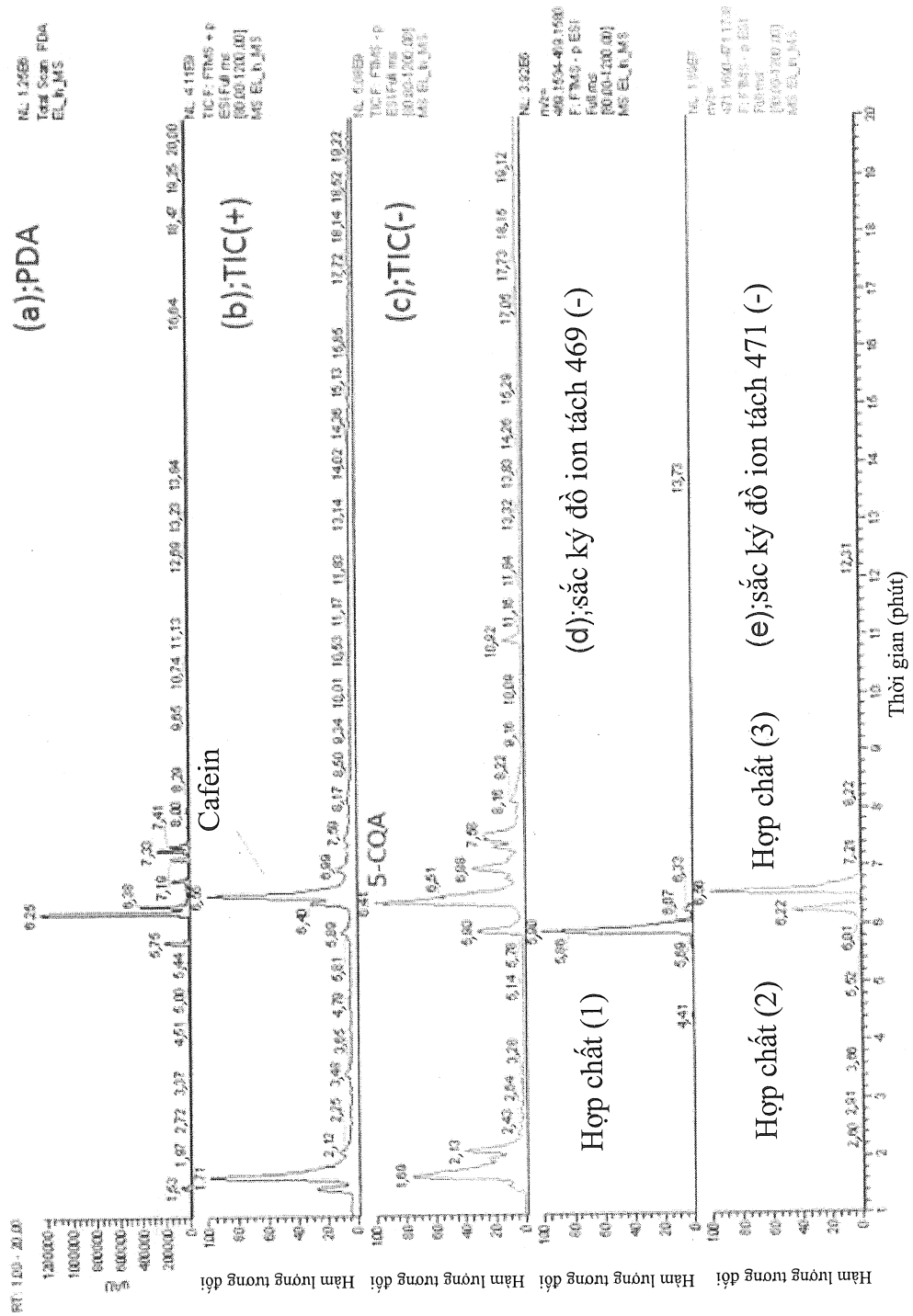


Fig. 2

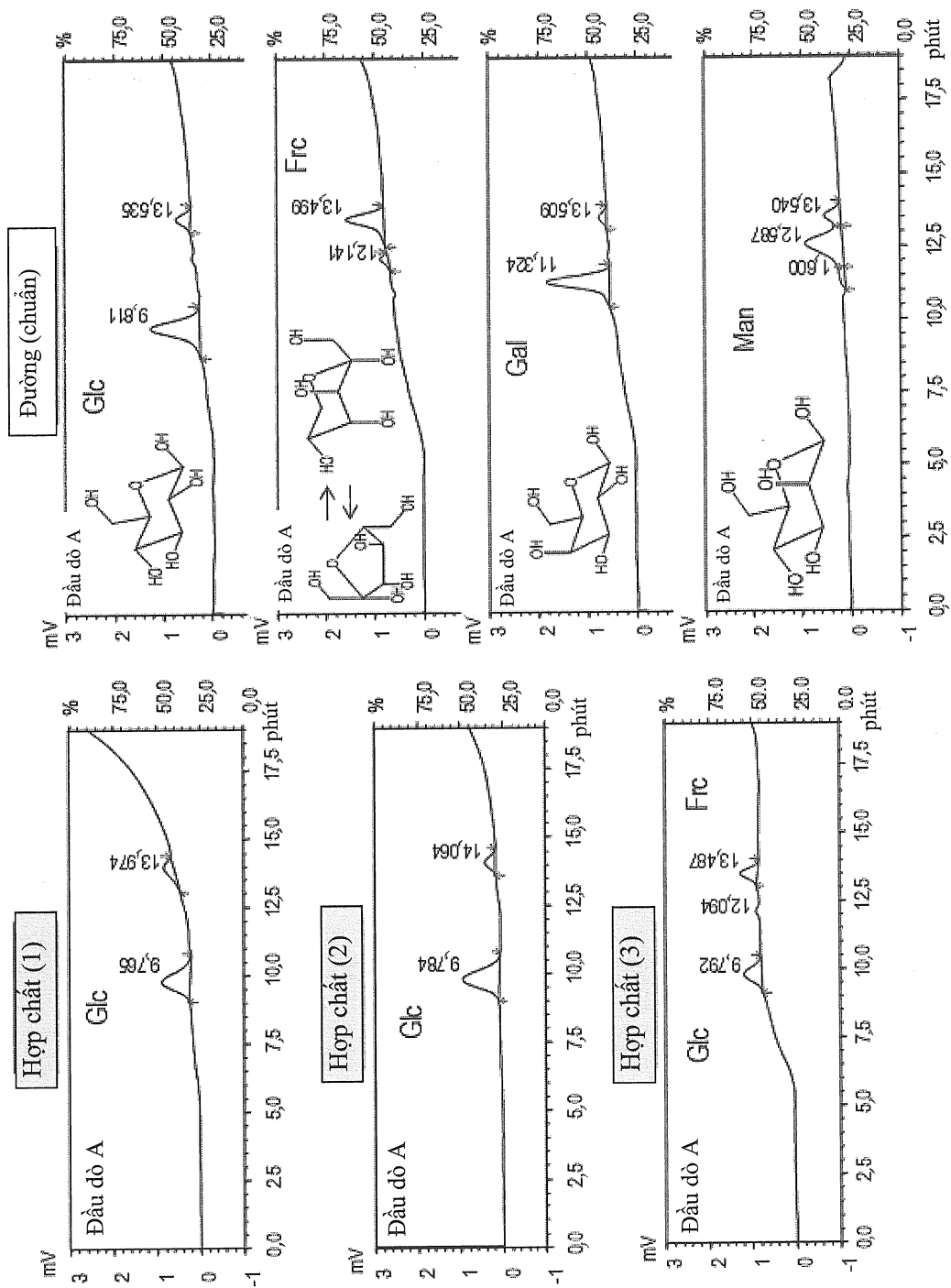


Fig. 3

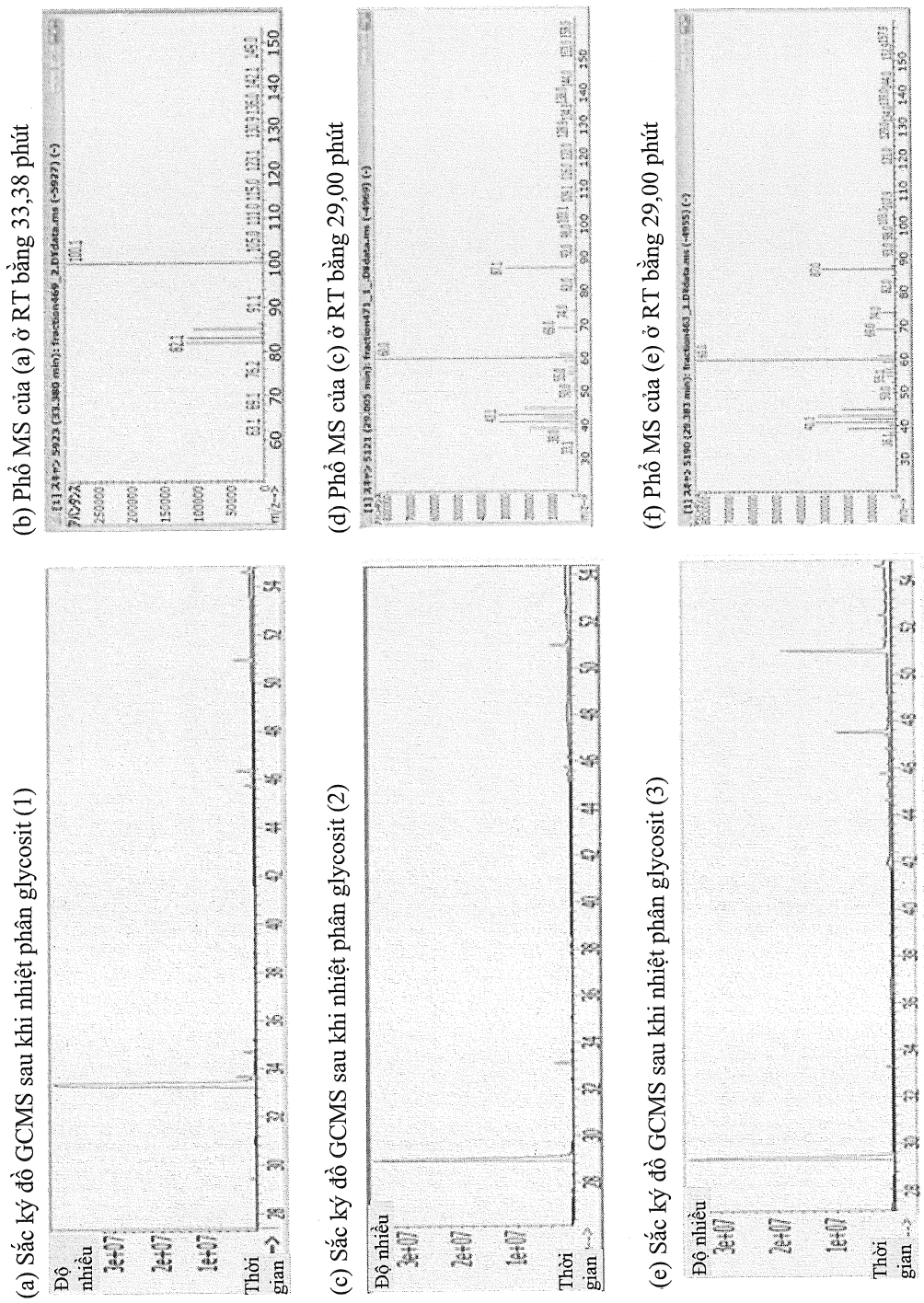


Fig. 4

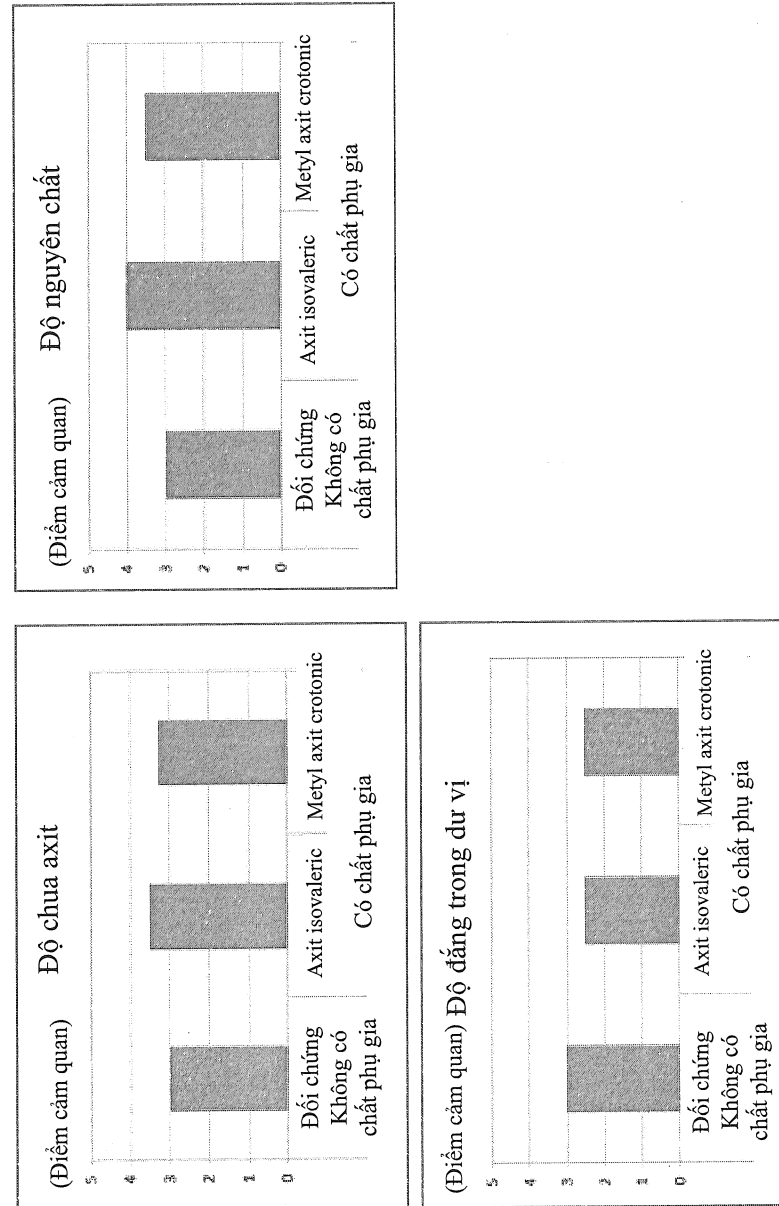


Fig. 5

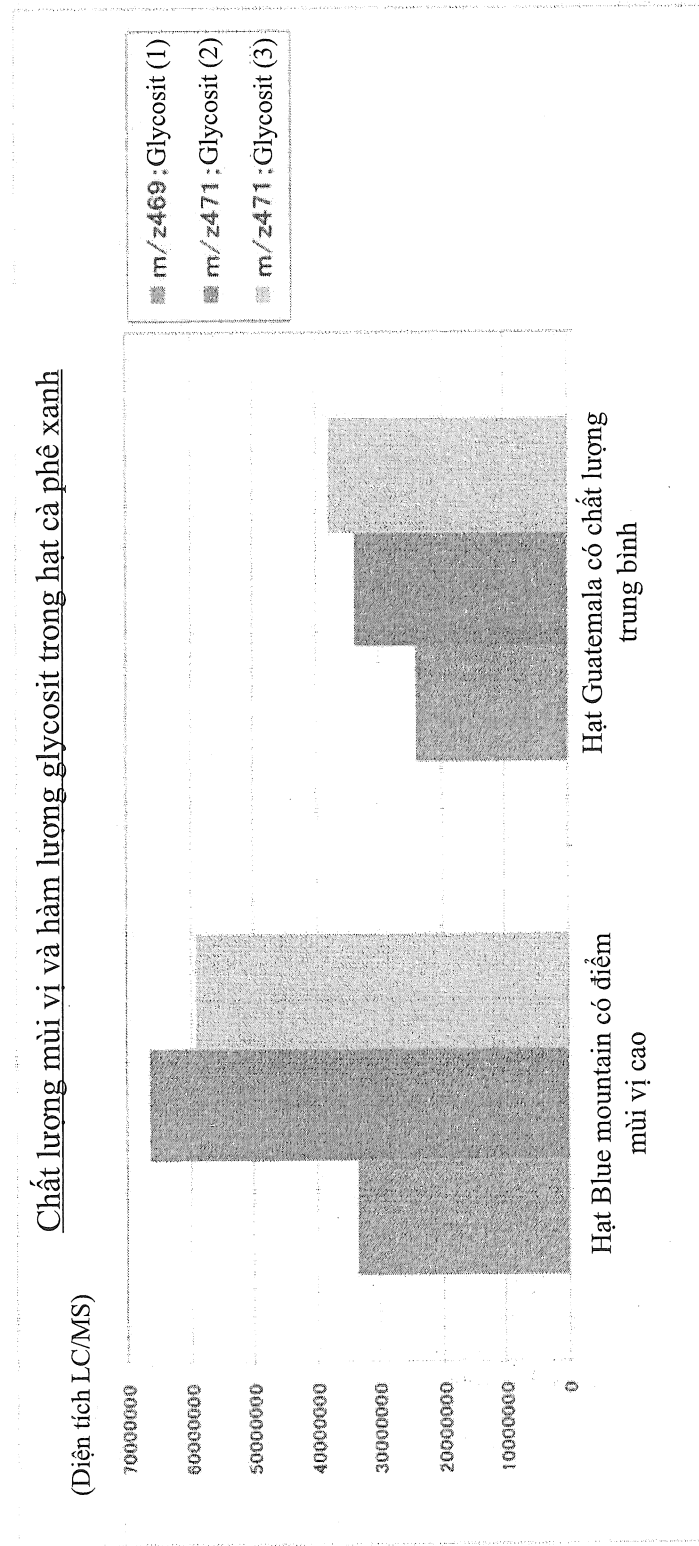
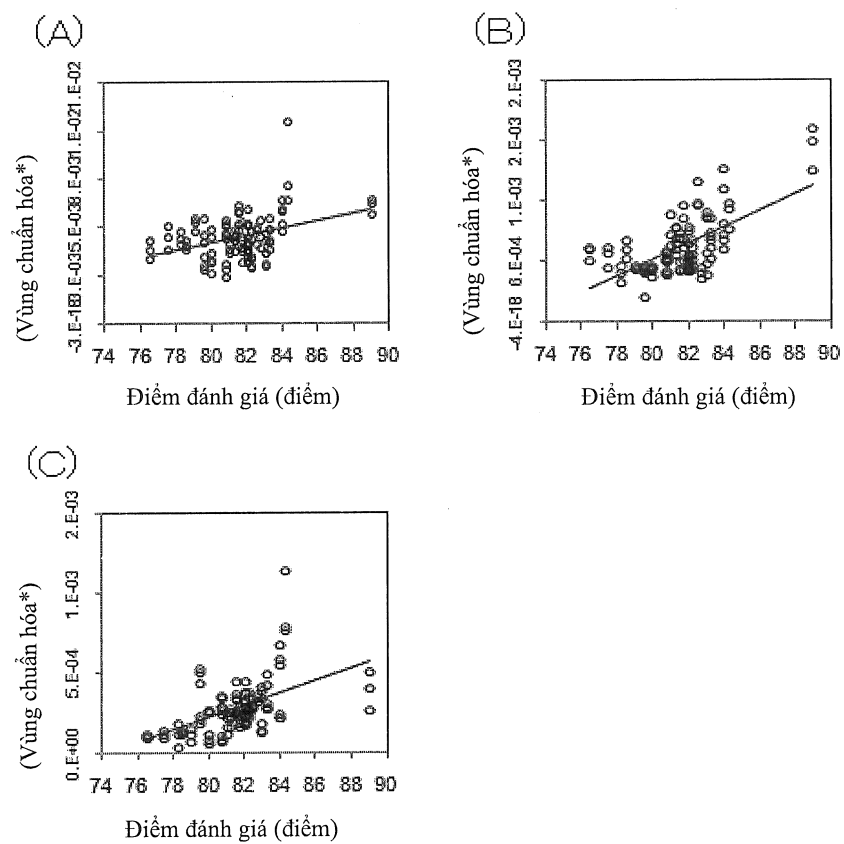
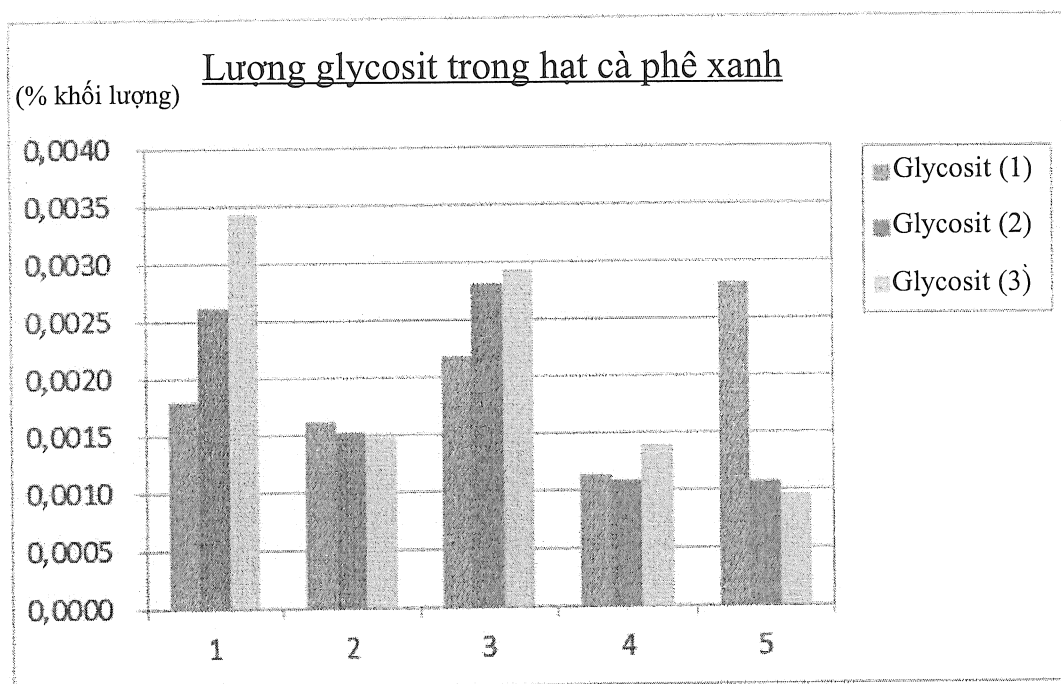


Fig. 6

* Vùng chuẩn hóa;
 Vùng phát hiện được chuẩn hóa bằng ion tổng

Fig. 7**Fig. 8**