



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003036

(51) C07C 67/48
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00219

(22) 19/05/2020

(45) 25/01/2023 418

(43) 26/10/2020 391A1

(73) 1. Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Nhà 1H, Số 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

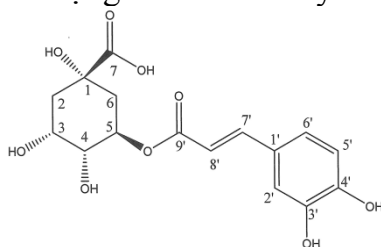
2. Trung tâm nghiên cứu và chuyển giao công nghệ (VN)

Trung tâm nghiên cứu và chuyển giao công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Lê Minh Hà (VN); Đỗ Thị Thanh Huyền (VN); Lê Ngọc Hùng (VN); Ngô Thị Phương (VN).

(54) QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT VÀ TINH CHẾ HỢP CHẤT AXIT CLOROGENIC TỪ HẠT CÀ PHÊ XANH

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất và tinh chế axit clorogenic (5-O-caffeoylquinic axit) có công thức (I) từ hạt cà phê xanh. Hợp chất axit clorogenic đã được nghiên cứu có tác dụng ức chế tích lũy chất béo và điều hòa chuyển hóa glucoza ở người.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất axit clorogenic (axit 5-O-caffeoylquinic) từ hạt cà phê xanh.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cà phê là tên một chi thực vật thuộc họ Cà phê (Rubiaceae). Chi cà phê bao gồm nhiều loài cây lâu năm khác nhau. Tuy nhiên, không phải loài nào cũng chứa caffein trong hạt. Chỉ có hai loài cà phê có ý nghĩa kinh tế. Loài thứ nhất có tên thông thường trong tiếng Việt là cà phê chè (tên khoa học: *Coffea arabica*), đại diện cho khoảng 61% các sản phẩm cà phê trên thế giới. Loài thứ hai là cà phê vối (tên khoa học: *Coffea canephora* hay *Coffea robusta*), chiếm gần 39% các sản phẩm cà phê. Ngoài ra, còn có *Coffea liberica* và *Coffea excelsa* (ở Việt Nam gọi là cà phê mít) với sản lượng không đáng kể. Cây cà phê được biết đến là một thứ đồ uống nổi tiếng trên toàn thế giới, đồng thời cà phê cũng là một cây thuốc quý.

Hạt cà phê được sử dụng làm thức uống từ thế kỷ thứ 9 tại vùng cao nguyên Ethiopia. Đến thế kỷ 15 lan rộng và được dùng phổ biến ở Thổ Nhĩ Kỳ, Ai Cập, rồi đến các nước Châu Âu, Mỹ. Hiện nay cà phê được xem là thức uống thông dụng bậc nhất thế giới, cách thưởng thức có nhiều khác biệt tùy theo vùng miền, vị trí địa lý, quốc gia. Hiện nay, có khoảng 60 nước trồng cà phê, trong đó phải kể đến những nước xuất khẩu cà phê hàng đầu như Braxin, Việt Nam, Indonesia, Ấn Độ, Malaysia, Uganda v.v.. Trong đó, Việt Nam là nước xuất khẩu cà phê vối đứng đầu nhất thế giới, chiếm gần một nửa sản lượng cà phê loại này.

Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, các lớp chất chính có trong hạt cà phê xanh là: các amino axit, các hydrat cacbon, axit béo, axit clorogenic (CGAs), các hợp chất bay hơi và các hợp chất hữu cơ khác. Đường chiếm 6% - 9% và cung cấp vị ngọt trong ly cà phê. Lipit, chủ yếu là triglyxerit, chiếm khoảng 16%. Protein và axit amin tự do chiếm 10% - 13% cà phê xanh theo trọng lượng khô.

Hai alkaloid, caffein và trigonellin, mỗi thành phần chiếm khoảng 1% trọng lượng khô của hạt cà phê và đảm nhiệm cho phần lớn vị đắng và tính chất kích thích của cà phê. Caffein đóng góp khoảng 10% vị của cà phê và cây sản sinh một lượng caffein như là một biện pháp chống lại sự phá hoại của côn trùng. Trigonellin có lẽ là phần đóng góp lớn nhất cho vị đắng của cà phê, sản sinh ra nhiều hợp chất thơm. Các axit hữu cơ, chủ yếu là các axit chlorogenic (CGAs) cùng với các axit hữu cơ khác bao gồm citric, quinic, caffeic, malic, acetic, formic và các hợp chất thơm dễ bay hơi cung cấp mùi thơm của cà phê. Hạt cà phê xanh chứa hơn 200 chất dễ bay hơi nhưng ít mùi thơm. Việc rang tạo ra một lượng lớn các hợp chất thơm của cà phê và cho đến nay, các nhà nghiên cứu đã xác định hơn 800 chất dễ bay hơi trong hạt cà phê rang.

Hạt cà phê xanh chứa một lượng lớn axit chlorogenic (CGAs) mà khi rang sẽ phân hủy thành caffeic và axit quinic. Cả axit chlorogenic và axit quinic thu được được cho là cung cấp vị đắng cho cà phê. Tùy thuộc vào nhiệt độ và thời gian, quá trình rang sẽ liên tục phá vỡ CGAs, khi rang nhạt (ở nhiệt độ 230 – 250°C, trong thời gian 12 phút) 50% CGAs sẽ mất đi và chỉ để lại 20% (mất 80 – 100%) trong độ rang đậm. Tuy nhiên axit CGAs không bốc hơi, chúng chỉ phân hủy thành axit quinic và caffeic được thể hiện trong tài liệu của J. K. Moon và cộng sự, “Formation of Volatile Chemicals from Thermal Degradation of Less Volatile Coffee Components: Quinic Acid, Caffeic Acid, and Chlorogenic Acid”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010), 5465-5470 và trong tài liệu của A. Farah và cộng sự, “Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005), 1505-1513.

Được phát hiện vào năm 1932, axit chlorogenic (CGAs) là đại diện cho một gia đình lớn của các hợp chất este và axit trong cà phê xanh lẫn cà phê rang. Axit chlorogenic (CGAs) là tên gọi của một nhóm các hợp chất mono- và di-ester của axit caffeic, ferulic, và p-coumaric với nhóm hydroxyl của axit quinic, phổ biến gồm 7 dẫn xuất sau: 3-CQA (axit 3-Caffeoylquinic); 3,4-diCQA (axit 3,4-Dicaffeoylquinic) ; 3,5-diCQA (axit 3,5-Dicaffeoylquinic); 4-CQA (axit 4-

Caffeoyquinic); 4,5-diCQA (axit 4,5-Dicaffeoylquinic); 5-CQA (axit 5-Caffeoyquinic); và 5-FQA (axit 5-Feruloylquinic). Trong đó, hợp chất thông dụng nhất là axit 5-O-caffeoylquinic (5-CQA) thường được gọi là axit clorogenic được bộc lộ trong tài liệu của A. Farah và cộng sự, “Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans”, *The Journal of Nutrition*, 138 (2008), 2309–2315.

Axit clorogenic (CGAs) là hợp chất phenolic chính trong hạt cà phê và cà phê được cho là có hàm lượng CGAs cao nhất so với các loài thực vật khác. Hạt cà phê xanh được báo cáo là chứa khoảng 5–14% axit clorogenic (CGAs). Nghiên cứu cho thấy một chế độ ăn giàu CGAs giúp ngăn ngừa các bệnh như ung thư, tim mạch, lão hóa và suy giảm các tế bào thần kinh. Nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng việc tiêu thụ sản phẩm chiết xuất từ cà phê xanh có tác dụng hạ huyết áp trên người và chuột thí nghiệm, cải thiện mạch máu, ức chế tích lũy chất béo - tăng cân ở người và chuột, điều hòa chuyển hóa glucoza ở người. Các hoạt tính này được cho là do sự có mặt của CGAs trong hạt cà phê xanh. Mặt khác, CGAs đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành nên màu sắc, hương vị của hạt cà phê quyết định đến chất lượng của loại đồ uống này. Các nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra mối liên hệ giữa thành phần CGAs và chất lượng của cà phê như trong tài liệu của M. Shengxi và cộng sự, “Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucoza and Lipids Metabolism: A Review”, Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013 và trong tài liệu của I. Onakpoya và cộng sự, “The Use of Green Coffee Extract as a Weight Loss Supplement: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Clinical Trials”, *Gastroenterol Res Pract*, 2011.

Rối loạn chuyển hóa glucoza và lipid liên quan chặt chẽ với các bệnh về chuyển hóa như béo phì, tiểu đường, gan nhiễm mỡ, bệnh tim mạch và ung thư được bộc lộ trong tài liệu của M. Shengxi và cộng sự, “Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucoza and Lipids Metabolism: A Review”, Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013. Gần đây, việc ứng dụng axit CGAs liên quan đến chuyển hóa glucoza và lipid

được quan tâm nhiều. Đặc biệt hơn nữa, những nghiên cứu mới cho thấy tác dụng có lợi của axit clorogenic đối với hội chứng chuyển hóa (Metabolic syndrome). Tạp chí Nutrient Advance khuyến nghị sử dụng chiết xuất bột cà phê xanh chứa axit clorogenic với 6 lợi ích đối với sức khỏe bao gồm hạ huyết áp, điều chỉnh đường huyết, mỡ máu, tim mạch và kháng viêm.

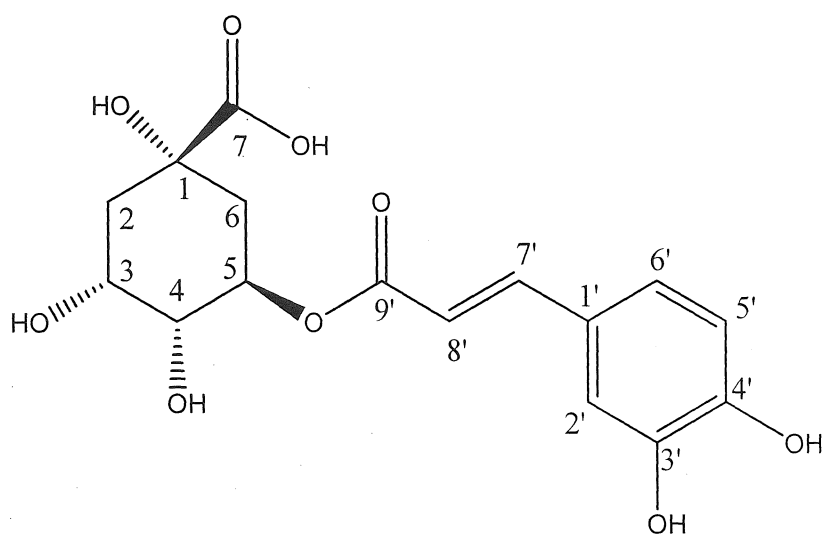
Nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng để chiết xuất và phân lập axit clorogenic từ hạt cà phê xanh. Cho tới nay, vấn đề chiết xuất làm giàu axit clorogenic trong hạt cà phê vẫn nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học. Trước kia, hạt cà phê được đông lạnh bởi nitơ lỏng để làm giảm tối đa sự ôxi hóa CGAs và nghiền nhỏ. Sau đó, hầu hết các phương pháp chiết xuất CGAs đều sử dụng đến các dung môi hữu cơ như metanol - nước hay 2-propanol 70% (v/v) được bộc lộ trong tài liệu của G. Budryn và cộng sự, "Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans", *Eur Food Res Technol*, 228 (2009), 913–922 và trong tài liệu của C. L. Ky và cộng sự, "Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Coffea* sp.)", *J. Agric. Food Chem*, 45 (1997), 786-790. Những năm gần đây, một số phương pháp chiết xuất phân lập các axit clorogenic (CGAs) từ hạt cà phê xanh sử dụng than hoạt tính làm chất hấp phụ, sử dụng dung môi chiết là nước, các dung môi phân cực như metanol, etanol, propanol, n-butanol hoặc dung môi ít phân cực hơn như etyl axetat, axeton, cloroform, n-hexan với nhiệt độ chiết thích hợp hoặc sử dụng dưới sự hỗ trợ của sóng vi ba ở cường độ thích hợp được bộc lộ trong tài liệu của D. Uppal và cộng sự, "Green coffee bean extract and method thereof", US20170007658A1 và trong tài liệu của L. S. Mirna và cộng sự, "Isolation of green coffee chlorogenic axits using activated carbon", *Journal of Food Composition and Analysis*, 33 (2014), 55–58 cũng như trong tài liệu của U. Rohit và cộng sự, "Microwave-assisted extraction of chlorogenic axits from green coffee beans", *Food Chemistry*, 130 (2012), 184–188.

Nước ta hiện rất dồi dào nguồn nguyên liệu hạt cà phê xanh hữu cơ, tươi (vùng trồng cà phê nổi tiếng các tỉnh Tây nguyên, Vựa cà phê robusta tại Buôn

Ma thuật đứng đầu thế giới) để sản xuất nguyên liệu đạt tiêu chuẩn quốc tế phù hợp thị hiếu hiện đại, định hướng xuất khẩu. Ngoài ra, ở trong nước, nguồn hạt cà phê có chất lượng thấp không đủ tiêu chuẩn xuất khẩu là một lợi thế làm nguồn nguyên liệu để chiết xuất và tinh chế axit chlorogenic. Trong khi đó trong nước chưa có nghiên cứu về công nghệ chiết xuất axit chlorogenic từ hạt cà phê xanh.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề cập đến quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất axit chlorogenic (axit 5-O-caffeoylquinic) có công thức cấu tạo (I) từ nguyên liệu hạt cà phê xanh.



(I)

Hợp chất axit chlorogenic có tác dụng ức chế tích lũy chất béo và điều hòa chuyển hóa glucoza nên được sử dụng là nguyên liệu để sản xuất sản phẩm hỗ trợ giảm cân và tiểu đường. Hợp chất (I) được phân lập từ dịch chiết chứa nước hoặc dịch chiết dung môi hữu cơ của hạt cà phê xanh. Dung môi hữu cơ được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metanol, etanol, axeton. Trong số chúng, etanol là được ưu tiên.

Theo đó, quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất axit chlorogenic từ hạt cà phê xanh bao gồm các bước:

(i) sấy hạt cà phê xanh (cà phê nhân) ở nhiệt độ từ 75 đến 80°C trong thời gian từ 5 đến 6 giờ, rồi xay thành bột mịn;

(ii) ngâm chiết bột thu được ở bước (i) bằng dung môi hữu cơ theo tỷ lệ 3 lít dung môi/1 kg mẫu, tiến hành từ 1 đến 3 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 1 đến 5 giờ ở nhiệt độ nằm từ 60°C đến 80°C để thu được dịch chiết, trong đó dung môi hữu cơ được sử dụng bao gồm nước tinh khiết và etanol 96 độ, sau đó gom các dịch chiết dung môi hữu cơ từ các lần ngâm chiết thu được dịch chiết 1;

(iii) cô quay dịch chiết 1 thu được ở bước (ii) để loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết 1;

(iv) hòa tan cao chiết 1 thu được ở bước (iii) vào nước theo tỷ lệ 1 lít nước/1 kg cao, sau đó bổ sung etanol 96 độ để tạo kết tủa với protein, chất nhầy và tạp chất có trong cao chiết 1;

(v) tiến hành ly tâm để tách loại kết tủa protein, chất nhầy và tạp chất có trong cao chiết 1 để thu được dịch chiết 2;

(vi) cô quay dịch chiết 2 thu được ở bước (v) để loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết 2;

(vii) tách phân đoạn cao chiết 2 thu được ở bước (vi) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ bằng 1/10 theo khối lượng) và dung môi giải hấp là hệ clorofom-metanol ở các tỷ lệ 100/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 theo thể tích, sau đó thu gom phân đoạn giải hấp từ hệ dung môi tỷ lệ 5/1 (phân đoạn ký hiệu E2), tiếp theo, cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 3;

(viii) phân tách cao chiết 3 thu được ở bước (vii) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha đảo C₁₈, sau đó rửa giải bằng hệ dung môi etanol-nước tỷ lệ 1:1 theo thể tích, trong đó các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường, tiếp theo gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn E2.1, E2.2, E2.3;

(ix) cô quay phân đoạn E2.2 để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 4; và

(x) tinh chế cao chiết 4 bằng hệ dung môi etanol-nước tỷ lệ 3:1 theo thể tích, thu được hợp chất axit clorogenic có công thức (I) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Lấy hạt cà phê xanh đem nghiền nhỏ và tiến hành chiết bằng nước hoặc dung môi hữu cơ theo phương pháp được mô tả dưới đây. Các phương pháp sắc ký để sử dụng cho phương pháp theo giải pháp hữu ích bao gồm phương pháp sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 và RP18 F254 (Merck-Đức), trong đó các vết chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng là 254 và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H_2SO_4 10% phun đều lên bản mỏng rồi sấy ở nhiệt độ cao cho đến khi hiện màu; và phương pháp sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ silica gel pha thường hoặc pha đảo C18. Các dung môi hữu cơ sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metanol, etanol, clorofom, axeton, n-hexan. Để xác định cấu trúc của hợp chất thu được, các tác giả giải pháp hữu ích sử dụng các phương pháp phổ bao gồm phổ cộng hưởng từ nhân (^1H -NMR và ^{13}C -NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS trên máy Waters Q-TOF micromass spectrometer Waters Q-TOF micromass spectrometer, phổ lưỡng sắc tròn CD trên máy JASCO J-1100 spectropolarimeter.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất axit clorogenic từ hạt cà phê xanh bao gồm các bước:

(i) Sấy hạt cà phê xanh (cà phê nhân) ở nhiệt độ từ 75 đến 80°C trong thời gian từ 5 đến 6 giờ, rồi xay thành bột mịn;

(ii) Ngâm chiết bột thu được ở bước (i) bằng dung môi hữu cơ theo tỷ lệ 3 lít dung môi/1 kg mẫu, tiến hành từ 1 đến 3 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 1 đến 5 giờ ở nhiệt độ từ 60°C đến 80°C để thu được dịch chiết, trong đó dung môi hữu cơ được sử dụng bao gồm nước tinh khiết và etanol 96 độ, sau đó gom các dịch chiết dung môi hữu cơ từ các lần ngâm chiết thu được dịch chiết 1;

(iii) Cô quay dịch chiết 1 thu được ở bước (ii) để loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết 1;

(iv) Hòa tan cao chiết 1 thu được ở bước (iii) vào nước theo tỷ lệ 1 lít nước/1 kg cao, sau đó bổ sung etanol 96 độ để tạo kết tủa với protein, chất nhầy và tạp chất có trong cao chiết 1;

(v) Tiến hành ly tâm để tách loại kết tủa protein, chất nhầy và tạp chất có trong cao chiết 1 để thu được dịch chiết 2;

(vi) Cô quay dịch chiết 2 thu được ở bước (v) để loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết 2;

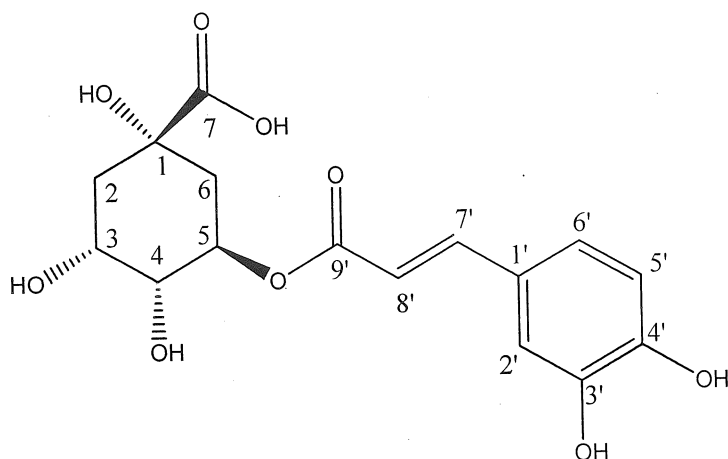
(vii) Tách phân đoạn cao chiết 2 thu được ở bước (vi) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ bằng 1/10 theo khối lượng) và dung môi giải hấp là hệ clorofom-metanol ở các tỷ lệ 100/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 theo thể tích, sau đó thu gom phân đoạn giải hấp từ hệ dung môi tỷ lệ 5/1 (phân đoạn ký hiệu E2), tiếp theo, cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 3;

(viii) Phân tách cao chiết 3 thu được ở bước (vii) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha đảo C₁₈, sau đó rửa giải bằng hệ dung môi etanol-nước tỷ lệ 1:1 theo thể tích, trong đó các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng pha thường, tiếp theo gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn E2.1, E2.2, E2.3;

(ix) Cô quay phân đoạn E2.2 để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 4; và

(x) Tinh chế cao chiết 4 bằng hệ dung môi etanol-nước tỷ lệ 3:1 theo thể tích, thu được hợp chất axit clorogenic có công thức (I) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất có công thức (I) theo sáng chế có tên khoa học theo IUPAC là 5-O-caffeoylquinic axit có công thức cấu tạo sau:



(I)

Hợp chất này có các thông số hoá lý như sau:

- Chất rắn màu trắng;
- Công thức phân tử là $C_{16}H_{18}O_9$;
- Phổ khối lượng ESI-MS m/z : 355 $[M + H]^+$;
- Phổ 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 7,54 (1H, d, $J = 16,0$, H-7'), 7,06 (1H, brs, H-2'), 6,95 (1H, d, $J = 8,0$, H-6'), 6,79 (1H, d, $J = 8,0$, H-3'), 6,28 (1H, d, $J = 16,0$, H-8'), 5,34 (1H, m, H-5), 4,18 (1H, brd, $J = 3,0$, H-3), 3,75 (1H, dd, $J = 2,5, 8,0$, H-4), 2,04–2,27 (4H, m, H-2, H-6);
- Phổ ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 175,61 (C-7), 167,30 (C-9'), 148,09 (C-4'), 145,68 (C-7'), 145,30 (C-3'), 126,39 (C-1'), 121,61 (C-6'), 115,10 (C-5'), 113,80 (C-2'), 113,79 (C-8'), 74,70 (C-1), 72,09 (C-4), 70,50 (C-5), 69,90 (C-3), 37,40 (C-6), 36,79 (C-2).

Quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất axit chlorogenic theo giải pháp hữu ích là đơn giản, dễ thực hiện và cho phép phân lập được hợp chất axit chlorogenic tinh khiết ra khỏi hỗn hợp của nhiều chất từ hạt cà phê xanh. Giai đoạn chiết xuất hạt cà phê xanh theo giải pháp hữu ích đã sử dụng hỗn hợp dung môi etanol: nước tỷ lệ 7:3 và để tạo phân đoạn tổng chứa các thành phần hoạt chất chính không bị lẫn tạp so với các nghiên cứu trước đây là dung môi nước; giải pháp hữu ích đã sử dụng etanol 96 độ để loại protein, chất nhầy, tạp chất thay cho chiết xuất phân

đoạn bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần (n-hexan, etyl axetat) như các nghiên cứu và công bố trước đây; cũng như việc tinh chế hợp chất axit clorogenic đã sử dụng dung môi là cồn và nước đều là các dung môi an toàn thân thiện môi trường và chưa từng được nghiên cứu trước đó đồng thời chưa từng được công bố trong bất kỳ ấn phẩm nào trước đây. Hợp chất axit clorogenic đã được nghiên cứu có tác dụng ức chế tích lũy chất béo và điều hòa chuyển hóa glucoza. Việc cải tiến quy trình chiết xuất và tinh chế hoạt chất axit clorogenic từ hạt cà phê xanh của giải pháp hữu ích mở ra hướng ứng dụng để sản xuất axit clorogenic làm nguyên liệu để sản xuất thuốc hoặc thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị giảm cân và tiểu đường.

Giải pháp hữu ích sẽ được giải thích tiếp bằng ví dụ và phương án minh họa sau. Tuy nhiên, ví dụ này không được coi là giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích. Các cải biến sẽ dễ dàng được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng sẽ nằm trong phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích và của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất axit clorogenic từ hạt cà phê xanh Robusta của Việt Nam

2 kg hạt cà phê xanh (loại Robusta trồng tại Đắk Lắk, Việt Nam) được mua trên thị trường, được sấy khô ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 5 giờ, sau đó xay thành bột mịn thu được khoảng 1,8 kg bột mẫu khô. Ngâm chiết 1,8 kg nguyên liệu bột khô này bằng 6 lít dung môi etanol:nước tỷ lệ 7:3 ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 5 giờ. Dịch chiết được rút kiệt ra rồi bổ sung 6 lít dung môi etanol:nước tỷ lệ 7:3 ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 5 giờ và ngâm tiếp lần 2. Sau 2 lần ngâm chiết như vậy, các dịch chiết được gom lại, lọc bằng giấy lọc kích cỡ lỗ lọc 15 µm và cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 350 g cao chiết tổng, ký hiệu là cao chiết 1.

Hòa tan cao chiết 1 vào 350 ml nước cất rồi bổ sung etanol 96 độ và khuấy đều để kết tủa hết protein, chất nhầy, tạp chất. Để lắng dung dịch và tiến hành ly tâm ở tốc độ 400 vòng/phút.

Tách loại tủa ở bên dưới dịch sau ly tâm sau đó cô loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 46,0 g cao chiết

Tách phân đoạn cao chiết 2 thu được trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ = 1/10 theo khối lượng, cột nhồi đường kính trong 5 cm) và dung môi giải hấp là hệ clorofom/metanol ở các tỷ lệ 100/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 theo thể tích. Thu gom phân đoạn giải hấp từ hệ dung môi tỷ lệ 5/1 (phân đoạn ký hiệu E2) rồi cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 17,5 g cao chiết 3.

Tiến hành chạy sắc ký đối với cao chiết 3 trên cột chất hấp phụ silica gel pha đảo C_{18} , rửa giải bằng hệ dung môi etanol-nước tỷ lệ 1:1 theo thể tích, thu được 3 phân đoạn.

Cô quay phân đoạn thứ 2 để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 4.

Tinh chế cao chiết 4 bằng hệ dung môi etanol-nước tỷ lệ 3:1 theo thể tích, thu được 2,5 gam hợp chất axit clorogenic (hay 5-O-caffeoylquinic axit) có công thức (I) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Cấu trúc hóa học của axit clorogenic (I) được xác định bằng các số liệu phổ khối lượng ESI-MS (m/z : 355 $[M + H]^+$) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H và ^{13}C NMR của hợp chất (I):

Bảng 1. Số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H và ^{13}C NMR của hợp chất (I):

C	$\delta_H^{a, b}$	$\delta_C^{a, c}$
1		74,70
2	2,04–2,27 (2H, m, H-2)	36,79
3	4,18 (1H, brd, $J = 3,0$, H-3)	69,90

1		74,70
2	2,04–2,27 (2H, m, H-2)	36,79
3	4,18 (1H, brd, $J = 3,0$, H-3)	69,90
4	3,75 (1H, dd, $J = 2,5, 8,0$, H-4)	72,09
5	5,34 (1H, m, H-5)	70,50
6	2,04–2,27 (2H, m, H-6)	37,40
7		175,61
1 ^a		126,39
2 ^a	7,06 (1H, brs, H-2 ^a)	113,80
3 ^a		145,30
4 ^a		148,09
5 ^a	6,79 (1H, d, $J = 8,0$, H-3 ^a)	115,10
6 ^a	6,95 (1H, d, $J = 8,0$, H-6 ^a)	121,61
7 ^a	7,54 (1H, d, $J = 16,0$, H-7 ^a)	145,68
8 ^a	6,28 (1H, d, $J = 16,0$, H-8 ^a)	113,79
9 ^a		167,30

^aĐo trong CD₃OD, ^b500 MHz, ^c125 MHz

Cấu trúc của hợp chất có công thức (I) được so sánh với cơ sở dữ liệu về hợp chất hóa học và tương tự với hợp chất axit chlorogenic được bộc lộ trong tài liệu của C. Wan và cộng sự, “Caffeoylquinic Acids from the Aerial Parts of *Chrysanthemum coronarium* L.”, Plants, 6 (2017), 10-17.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất axit chlorogenic từ hạt cà phê xanh theo giải pháp hữu ích đơn giản và dễ thực hiện. Axit chlorogenic thu được có tác dụng ức chế tích lũy chất béo và điều hòa chuyển hóa glucoza nên được sử dụng là nguyên liệu để sản xuất sản phẩm hỗ trợ giảm cân và tiểu đường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết xuất và tinh chế hợp chất axit clorogenic từ hạt cà phê xanh bao gồm các bước:

(i) sấy hạt cà phê xanh (cà phê nhân) ở nhiệt độ từ 75 đến 80°C trong thời gian từ 5 đến 6 giờ, rồi xay thành bột mịn;

(ii) ngâm chiết bột thu được ở bước (i) bằng dung môi hữu cơ theo tỷ lệ 3 lít dung môi/1 kg mẫu, tiến hành từ 1 đến 3 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 1 đến 5 giờ ở nhiệt độ từ 60°C đến 80°C, thu được dịch chiết, trong đó dung môi hữu cơ được sử dụng bao gồm nước tinh khiết, etanol 96 độ, sau đó gom các dịch chiết dung môi hữu cơ từ các lần ngâm chiết thu được dịch chiết 1;

(iii) cô quay dịch chiết 1 thu được ở bước (ii) để loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết 1;

(iv) hòa tan cao chiết 1 thu được ở bước (iii) vào nước theo tỷ lệ 1 lít nước/1 kg cao, sau đó bổ sung etanol 96 độ để tạo tủa với protein, chất nhầy và tạp chất có trong cao chiết 1;

(v) tiến hành ly tâm để tách loại tủa protein, chất nhầy và tạp chất có trong cao chiết 1 để thu được dịch chiết 2;

(vi) cô quay dịch chiết 2 thu được ở bước (v) để loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết 2;

(vii) tách phân đoạn cao chiết 2 thu được ở bước (vi) trên cột sắc ký với chất hấp phụ silica gel pha thường (cỡ hạt 230-400 mesh, tỷ lệ cao chiết/chất hấp phụ bằng 1/10 theo khối lượng) và dung môi giải hấp là hệ clorofom-metanol ở các tỷ lệ 100/1, 20/1, 5/1 và 1/1 và 1/100 theo thể tích, sau đó thu gom phân đoạn giải hấp từ hệ dung môi tỷ lệ 5/1 (phân đoạn ký hiệu E2), tiếp theo cô quay loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết 3;

(viii) phân tách cao chiết 3 thu được ở bước (vii) bằng sắc ký cột với chất hấp phụ là silica gel pha đảo C₁₈, sau đó rửa giải bằng hệ dung môi etanol-nước tỷ lệ 1:1 theo thể tích, trong đó các dịch giải hấp ra được chấm kiểm tra trên sắc

ký lớp mỏng pha thường, tiếp theo gom những dịch giải hấp có sắc ký đồ giống nhau thu được 3 phân đoạn E2.1, E2.2, E2.3;

(ix) cô quay phân đoạn E2.2 để loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết 4; và

(x) tinh chế cao chiết 4 thu được ở bước trên bằng hệ dung môi etanol-nước theo tỷ lệ 3:1 theo thể tích, thu được hợp chất axit clorogenic có công thức (I) dưới dạng chất rắn màu trắng.