

VALIDATION OF A SIMULTANEOUS QUANTIFICATION METHOD OF CAFFEINE AND CHLOROGENIC ACID CONTENTS IN GREEN COFFEE BEAN BY USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Ha Hoang Anh Vinh, Hoang Thi Thu Huyen, Huynh Van Chung, Tran Luu Phuc, Le Trung Khoang^{*}
Buon Ma Thuot Medical University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 14/02/2023 Revised: 14/4/2023 Published: 19/4/2023 KEYWORDS Chlorogenic acid Caffeine Coffee HPLC Validation	The aim of study is to validate a quantitative method of caffeine (CAF) and chlorogenic acid (CGA) contents in green coffee bean by high performance liquid chromatography (HPLC). The analysis was performed on HPLC Waters e2695, Reliant C18 column (5 μm; 4.6x250 mm), using the mobile phase of formic acid 0.1% in water (A) and acetonitrile (B). The mobile phase gradients were operated at: initially 5% B, gradually increased to 10% B by 20 mins and remained constant until 30 mins. The sample injection volume was 10 μl. Flow rate was 1 ml/min. Measurement was taken at two wave lengths at 270 nm and 330 nm. The quantification process has been validated to meet the requirements of the ICH (International Conference on Harmonization). Results show that the method meets criteria such as specificity, linearity ($R^2 > 0.99$), high repeatability with RSD < 0.7% for peak area and RSD < 0.45% for retention time, limit of detection (≥ 0.06 μg/ml for CAF and 0.36 μg/ml for CGA), limit of quantification (≥ 0.19 μg/ml for CAF and 1.10 μg/ml for CGA). The accuracy of the method also meets requirements through the recovery rate ranging from 97.31 – 104.26%. Thus, the quantification method is suitable for simultaneous determination of caffeine and chlorogenic acid in green coffee beans.

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CAFFEIN VÀ ACID CHLOROGENIC TRONG HẠT CÀ PHÊ XANH BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Hà Hoàng Anh Vinh, Hoàng Thị Thu Huyền, Huỳnh Văn Chung, Trần Lưu Phúc, Lê Trung Khoang^{*}
Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 14/02/2023 Ngày hoàn thiện: 14/4/2023 Ngày đăng: 19/4/2023 TỪ KHÓA Acid chlorogenic Caffein Cà phê HPLC Thẩm định	Nghiên cứu được tiến hành nhằm mục đích thẩm định qui trình định lượng đồng thời caffein và acid chlorogenic trong hạt cà phê bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Quá trình phân tích được thực hiện trên máy HPLC Waters e2695, cột sắc ký Reliant C18 (5μm; 4,6x250 mm), pha động là acid formic 0,1% trong nước (A) và acetonitril (B). Dung môi pha động được chạy theo gradient nồng độ: Thời điểm ban đầu 5% B, tăng dần tới phút 20 là 10% B rồi giữ cố định cho tới phút 30 phút. Thể tích bơm mẫu là 10 μl. Tốc độ dòng 1 ml/phút. Đo ở 2 bước sóng 270 nm và 330 nm. Quy trình định lượng đã được thẩm định đáp ứng các yêu cầu của ICH (International Conference on Harmonization). Kết quả thu được cho thấy, phương pháp đạt yêu cầu với các chỉ tiêu: độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính ($R^2 > 0,99$), độ lặp lại cao với RSD < 0,7% đối với diện tích peak và RSD < 0,45 % đối với thời gian lưu, giới hạn phát hiện ($\geq 0,06$ μg/ml cho CAF và 0,36 μg/ml cho CGA), giới hạn định lượng ($\geq 0,19$ μg/ml cho CAF và 1,10 μg/ml cho CGA). Độ đúng của phương pháp cũng đạt yêu cầu thông qua chỉ số độ thu hồi nằm trong khoảng 97,31 – 104,26%. Do vậy, phương pháp định lượng phù hợp để xác định đồng thời hàm lượng caffein và acid chlorogenic trong hạt cà phê.

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7327>

^{*} Corresponding author. Email: Trungkhoang@gmail.com

1. Giới thiệu

Cà phê vốn là một trong những nông sản đặc trưng của Việt Nam và được trồng nhiều tại các tỉnh khu vực Tây Nguyên. Trong hạt cà phê, có nhiều các thành phần đã được nghiên cứu và công bố: caffein - CAF (1,5-3%), glucid (40-50%), lipid (5-10%), polyphenol (5-10%), aliphatic acids (2,4-2,5%) và một số các acid hữu cơ khác [1], [2]. Trong đó, acid chlorogenic (CGA - hợp chất thuộc nhóm polyphenol) có hàm lượng cao và nhiều hoạt tính sinh học đã được chứng minh trên mô hình động vật và nghiên cứu lâm sàng trên người như: điều trị tăng huyết áp, tiểu đường, rối loạn lipid huyết, chống oxy hóa, kháng khuẩn, bảo vệ gan, tác dụng hỗ trợ điều trị ung thư [2]-[5]. Acid chlorogenic trong hạt cà phê tồn tại ở 3 dạng đồng phân chính 3-caffeoylquinic, 4-caffeoylquinic và 5-caffeoylquinic. Trong đó, 5-caffeoylquinic chiếm tỷ lệ nhiều nhất và được coi là chất chỉ dấu sinh học (biomarker) trong các nghiên cứu về hoạt tính sinh học [1], [5]. Do vậy, trong nghiên cứu này sử dụng hoạt chất 5-caffeoylquinic (là peak cao nhất trong sắc ký đồ và được ký hiệu là CGA2) khi thẩm định qui trình định lượng.

Hiện nay, một số chế phẩm hỗ trợ điều trị rối loạn lipid huyết, giảm cân với thành phần chính là cao chiết từ hạt cà phê xanh đã có trên thế giới. Trong nước cũng đã có một số đề tài điều chế CGA từ cà phê xanh (green coffee bean – hạt cà phê thu hái khi chín nhưng chưa rang) với độ tinh khiết cao để làm nguồn nguyên liệu sản xuất [6]-[8]. Tuy nhiên, nghiên cứu về định lượng đồng thời cả 2 chất CGA và CAF trong cà phê hiện vẫn chưa có nhiều. Vì vậy, nghiên cứu thẩm định phương pháp định lượng đồng thời CGA và CAF trong cao chiết cà phê thu hái tại tỉnh Đắk Lắk được tiến hành, nhằm mục đích cung cấp phương pháp định lượng khả thi, tiết kiệm thời gian và chi phí.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, hóa chất nghiên cứu

Nguyên liệu: Hạt cà phê (*coffea arabica* và *coffea robusta*) được thu hái tại xã Ea Đar, huyện Ea Kar, tỉnh Đắk Lắk, vào thời điểm tháng 11/2022. Sau khi thu hái, hạt cà phê được loại bỏ tạp và đem đi sấy ở 60°C. Tách phần vỏ và nhân hạt cà phê, rồi xay thành bột (qua rây 1 mm), đựng trong túi PE và hút chân không để tránh ảnh hưởng của không khí và ẩm.

Chiết cao cà phê: Bột cà phê được chiết bằng dung môi ethanol 70%, chiết tổng cộng 3 lần mỗi lần chiết với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 10/1 (ml/g). Gộp lại tất cả dịch chiết và bay hơi dung môi trong máy cô quay chân không ở nhiệt độ không quá 60°C cho tới khi thu được cao mềm (độ ẩm < 20%). Bảo quản trong tủ lạnh (4 - 8°C).

Hóa chất: Chất chuẩn CGA (SigmaAldrich, 98%), chất chuẩn caffein (Việt Nam, 99%), ethanol (Fisher), acetonitril (Fisher), nước cất (Merck), acid formic (Merck). Tất cả các hoá chất đều đạt tiêu chuẩn cho HPLC.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,5 g cao chiết, hòa tan vừa đủ với ethanol 70% trong bình định mức 50 ml. Sau đó tiếp tục pha loãng với dung môi ethanol 70%. Lọc qua màng 0,45 µm và tiến hành chạy sắc ký.

Chuẩn bị mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 20 mg CGA chuẩn vào bình định mức 100 ml. Thêm ethanol 70% để hòa tan và vừa đủ đến vạch. Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn trong ethanol 70% để có các dung dịch với dãy nồng độ 2-15 µg/ml.

Cân chính xác khoảng 20 mg CAF chuẩn vào bình định mức 100 ml. Thêm ethanol 70% để hòa tan và vừa đủ đến vạch. Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn trong ethanol 70% để có các dung dịch với dãy nồng độ 1 - 10 µg/ml.

Mẫu trắng: Dung môi ethanol 70%.

Điều kiện sắc ký: Điều kiện sắc ký được tham khảo theo phương pháp của các tác giả Navarra và Adisya [9], [10], tuy nhiên có thay đổi chương trình chạy gradient và sử dụng acid formic thay

thể cho acid trifluoroacetic. Pha động acid formic 0,1% trong nước (A) và trong acetonitril (B). Dung môi pha động được chạy theo gradient nồng độ: Thời điểm ban đầu 5% B, tăng dần tới phút 20 là 10% B rồi giữ cố định cho tới phút 30 phút. Thể tích bơm mẫu là 10 μ l. Tốc độ dòng 1 ml/phút. Đo ở 2 bước sóng 270 nm và 330 nm.

Các thông số thẩm định: Tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn định lượng (LOQ) và giới hạn phát hiện (LOD) [11].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thẩm định qui trình định lượng

Tính tương thích hệ thống: Để đánh giá tính tương thích hệ thống, chúng tôi tiến hành lần lượt tiêm mẫu CGA và CAF chuẩn 8 lần vào hệ thống với điều kiện sắc ký đã chọn và ghi nhận sắc ký đồ. Kết quả chi tiết được trình bày trong bảng 1.

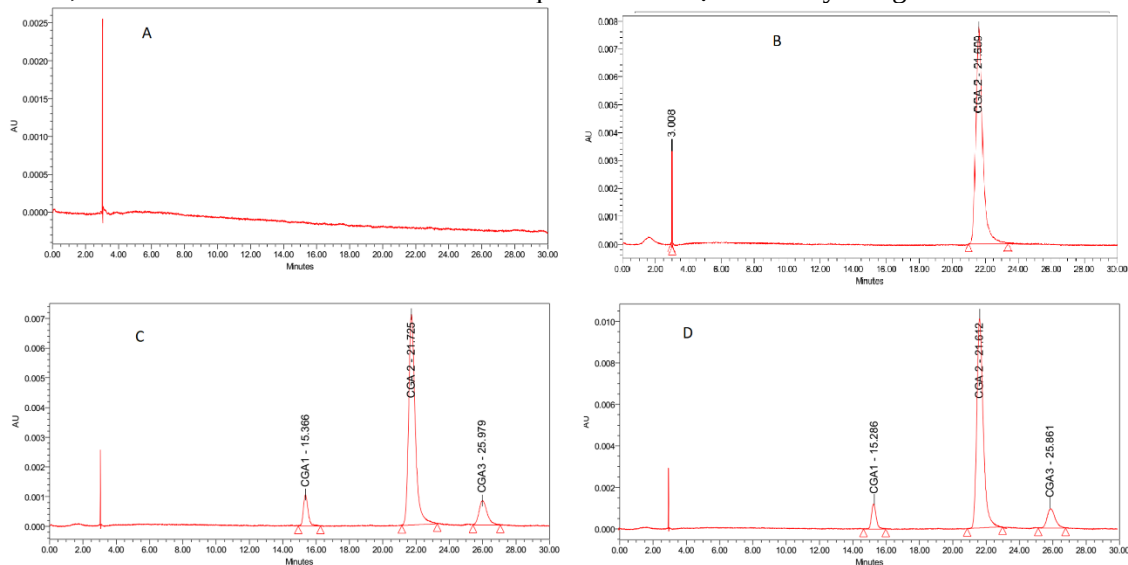
Bảng 1. Kết quả thời gian lưu và diện tích peak trong đánh giá tính tương thích hệ thống

STT		1	2	3	4	5	6	7	8	RSD (%)
CGA	T	21,703	21,646	21,640	21,622	21,616	21,609	21,642	21,656	0,136
	S	187819	186896	188916	187321	190875	189956	188832	187417	0,741
CAF	T	19,527	19,425	19,403	19,378	19,380	19,347	19,336	19,328	0,332
	S	155828	155539	155277	155716	155202	156043	156670	156708	0,368

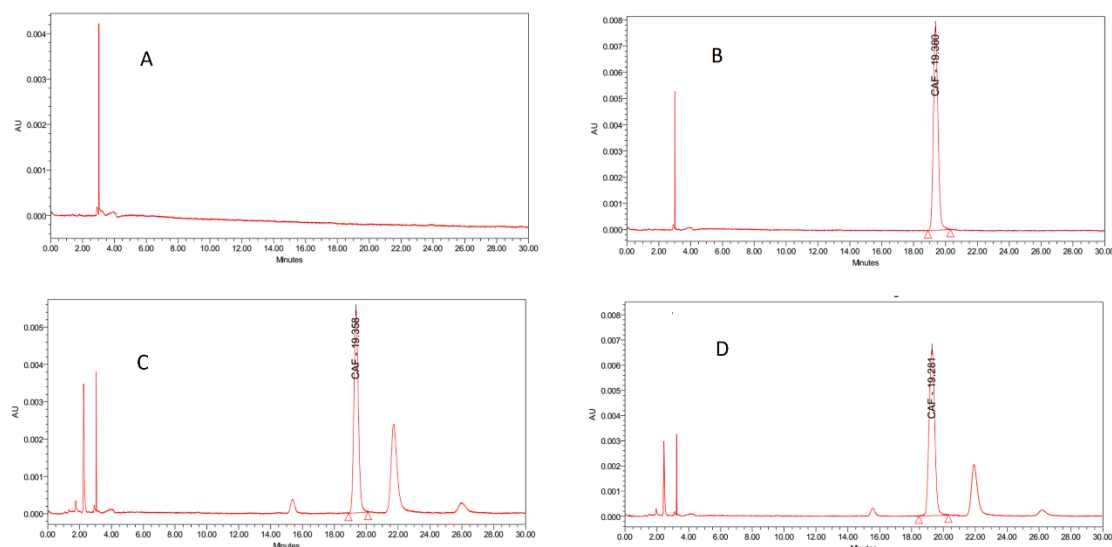
Ghi chú: T - thời gian lưu (phút); S - diện tích peak (μ Au.s)

Với độ lệch chuẩn thời gian lưu và diện tích peak của 8 lần chạy dưới 2%, vì vậy hệ thống HPLC sử dụng phù hợp để định lượng đồng thời CGA và CAF.

Độ đặc hiệu: Để đánh giá độ đặc hiệu, chúng tôi tiến hành chạy sắc ký với mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn. Kết quả chi tiết được trình bày trong Hình 1 và Hình 2.



Hình 1. Sắc ký đồ trong đánh giá độ đặc hiệu – định lượng CGA (đo ở 330 nm)
A - mẫu trắng; B - mẫu chuẩn; C - mẫu thử; D - mẫu thử thêm chuẩn



Hình 2. Sắc ký đồ trong đánh giá độ đặc hiệu – định lượng CAF (đo ở 270 nm)
A - mẫu trắng; B - mẫu chuẩn CAF; C - mẫu thử; D - mẫu thử thêm chuẩn CAF

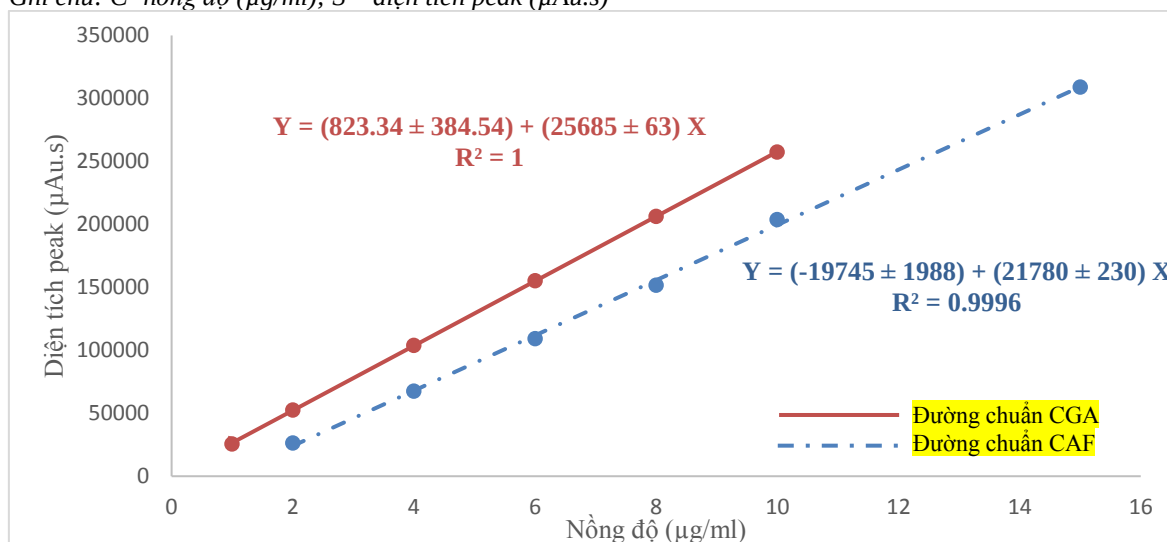
Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu trắng (A) không có peak nào trùng với mẫu chuẩn (B). Thời gian lưu của CGA và CAF trong mẫu chuẩn và mẫu thử tương đương nhau và khi thêm chất chuẩn tương ứng vào mẫu thử (D) thì peak CGA và CAF tăng lên so với mẫu thử (C). Do vậy, phương pháp định lượng đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

Tính tuyến tính: Pha dung dịch chuẩn với nồng độ trong khoảng 2 – 15 µg/ml đối với CGA và 1-10 µg/ml đối với CAF. Tiến hành chạy sắc ký với điều kiện đã chọn. Kết quả tính tuyến tính được trình bày trong bảng 2 và Hình 3.

Bảng 2. Nồng độ các chất chuẩn và diện tích peak trong đánh giá tính tuyến tính

STT		1	2	3	4	5	6
CGA	C	2	4	6	8	10	15
	S	26483	67684	109228	151761	197321	309137
CAF	C	1	2	4	6	8	10
	S	25785	52681	103825	155202	206271	257401

Ghi chú: C- nồng độ (µg/ml); S – diện tích peak (µAu.s)



Hình 3. Đường chuẩn của CAF và CGA trong nồng độ khảo sát

Với kết quả thu được chỉ ra rằng, có mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ CAF và CGA trong khoảng khảo sát. Hệ số hồi qui từ phương trình tuyến tính của CAF và CGA lần lượt là 1,0000 và 0,9996. Vì vậy, phương pháp định lượng đạt yêu cầu về tính tuyến tính.

Độ đúng: Độ đúng được đánh giá bằng phương pháp thêm chuẩn. Cho vào mẫu thử một lượng chất chuẩn ở các nồng độ khác nhau (80%, 100% và 120%) và tiến hành sắc ký ở điều kiện đã chọn. Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua độ thu hồi. Kết quả đánh giá được thể hiện trong bảng 3 và bảng 4.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp đối với CGA

STT	Nồng độ ban đầu ($\mu\text{g/ml}$)	Lượng chuẩn thêm ($\mu\text{g/ml}$)	Tổng ($\mu\text{g/ml}$)	Độ thu hồi (%)
1	10	8,21	18,30	101,09
2	10	8,21	18,45	102,92
3	10	8,21	18,17	99,51
Trung bình (%)				101,18
RSD (%)				1,69
4	10	10,43	20,15	97,31
5	10	10,43	20,26	98,37
6	10	10,43	20,45	100,19
Trung bình (%)				98,63
RSD (%)				1,48
7	10	12,23	22,66	103,52
8	10	12,23	22,74	104,17
9	10	12,23	22,46	101,88
Trung bình (%)				103,19
RSD (%)				1,14

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp đối với CAF

STT	Nồng độ ban đầu ($\mu\text{g/ml}$)	Lượng chuẩn thêm ($\mu\text{g/ml}$)	Tổng ($\mu\text{g/ml}$)	Độ thu hồi (%)
1	6,0	5,12	11,18	101,17
2	6,0	5,12	11,07	99,02
3	6,0	5,12	10,98	97,26
Trung bình (%)				99,15
RSD (%)				1,97
4	6,0	6,34	12,48	102,21
5	6,0	6,34	12,61	104,26
6	6,0	6,34	12,45	101,74
Trung bình (%)				102,73
RSD (%)				1,31
7	6,0	7,55	13,71	102,12
8	6,0	7,55	13,49	99,21
9	6,0	7,55	13,64	101,19
Trung bình (%)				100,84
RSD (%)				1,48

Độ thu hồi đều nằm trong khoảng 95 - 105% [12]. Do vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng để định lượng đồng thời CGA và CAF.

Độ lặp lại: Để đánh giá độ lặp lại, chúng tôi chạy 8 mẫu thử khác nhau có cùng nồng độ với điều kiện sắc ký đã chọn. Kết quả được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Thời gian lưu và diện tích peak của chất chuẩn trong đánh giá độ lặp lại

STT		1	2	3	4	5	6	7	8	RSD (%)
CGA	T	21,53	21,49	21,48	21,47	21,46	21,46	21,48	21,49	0,105
	S	203871	202948	204968	203373	206927	206008	204884	203469	0,682
CAF	T	19,70	19,57	19,54	19,50	19,51	19,46	19,45	19,44	0,436
	S	166017	165728	165466	165905	165391	166232	166859	166897	0,346

Ghi chú: T - thời gian lưu (phút); S – diện tích peak ($\mu\text{Au.s}$)

Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp HPLC dùng để định lượng CGA và CAF trong cà phê cho độ lặp lại tốt với $\text{RSD} < 2\%$ với cả 2 chỉ số là thời gian lưu và diện tích peak. Do vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Giới hạn phát hiện giới hạn định lượng: Dựa trên khoảng tuyến tính, xác định giá trị giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) theo công thức:

$$\text{LOD} = (3.3 \times \text{SD})/a \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = (10 \times \text{SD})/a \quad (2)$$

Trong đó: SD là độ lệch chuẩn; a là hệ số góc của đường thẳng $y = ax + b$

Kết quả xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Bảng kết quả xác định LOD, LOQ của CGA và CAF

Chất	Thông số	SD	a	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
CGA		2392,8	21780	0,36	1,10
CAF		494,2	25685	0,06	0,19

3.2. Xác định hàm lượng CGA và CAF trong hạt cà phê xanh tại Đắk Lắk

Áp dụng phương pháp định lượng để xác định hàm lượng CGA trong 2 mẫu cà phê *coffea arabica* và *coffea robusta*. Mỗi mẫu cà phê được định lượng 3 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả định lượng hàm lượng CGA và CAF trong 2 loại cà phê

	5-caffeoylquinic (%)	CGA tổng (%) *	CAF (%)
<i>Coffea arabica</i>	$4,29 \pm 0,04$	$5,40 \pm 0,03$	$1,76 \pm 0,02$
<i>Coffea robusta</i>	$5,31 \pm 0,03$	$6,35 \pm 0,04$	$2,08 \pm 0,04$
Thống kê T-test (p)	0,0008	0,0003	0,0068

Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới dạng mean $\pm$ SD; phép kiểm thống kê có ý nghĩa khi $p < 0,05$; *: tổng hàm lượng của cả 3 đồng phân tính theo 5-caffeoylquinic.

Về qui trình định lượng CGA, đã có một số công bố trong nước về phương pháp định lượng bằng HPLC cho chế phẩm trên thị trường chứa cao actiso, cao đặc Tòa sang hoặc dược liệu như kim ngân, ké đầu ngựa [7], [13], [14]. Các qui trình định lượng trong dược liệu không phải cà phê thường được áp dụng với chế độ chạy đẳng dòng để đơn giản hóa và dễ áp dụng, các hệ dung môi cụ thể thường được dùng là acid phosphoric 0,4% trong nước : acetonitril (87:13) [7], [13]. Tuy nhiên, khi định lượng CGA trong cao actiso, để tách được CGA so với các tạp khác, tác giả dùng chế độ gradien với hệ dung môi là acid phosphoric 0,1% trong nước : acetonitril (10:90) trong 21,5 phút đầu và 90:10 trong thời gian còn lại [14].

Đối với phương pháp định lượng đồng thời CGA và CAF trong hạt cà phê, chúng tôi chưa tìm thấy công bố nào trong nước. Trong khi đó, Việt Nam là nước có sản lượng cà phê lớn và ngày càng có nhiều nghiên cứu để sử dụng hạt cà phê trong bào chế các sản phẩm hỗ trợ sức khỏe. Với các công bố trên thế giới, qui trình định lượng thường được tiến hành với hệ dung môi là acid trong nước : acid trong acetonitril [15]-[17], hoặc sử dụng hệ dung môi acid trong nước : methanol [18], [19]. Điểm chung của các nghiên cứu định lượng đồng thời CGA và CAF trong hạt/chế phẩm chứa cà phê trên thị trường là áp dụng chế độ gradient nồng độ. Mục đích của việc

sử dụng gradient nồng độ để tách 3 đồng phân hiệu quả hơn, vì ngoài hoạt chất chính là 5-caffeoylquinic, trong hạt cà phê hàm lượng đồng phân 3 và 4-caffeoylquinic chiếm tỷ lệ khá cao (trong mẫu cà phê robusta mà chúng tôi định lượng, hàm lượng 2 đồng phân này chiếm khoảng 16,11%).

Với hệ dung môi là acid formic 0,1% trong nước (A) : acid formic 0,1% trong acetonitril (B), với chế độ gradient là A:B (95:5,v/v); 12,5-30 phút: A:B (90:10,v/v), chúng tôi áp dụng để định lượng riêng CGA trong hạt cà phê, sắc ký đồ tách được tốt với 3 đồng phân của CGA [20]. Tuy nhiên, khi đo tại bước sóng 270 nm thì peak của CAF và 5-caffeoylquinic không tách hoàn toàn, kết quả tương tự như sắc ký đồ của tác giả Vinson cùng cộng sự đã công bố [17]. Chính vì vậy, chúng tôi điều chỉnh lại hệ dung môi là acid formic 0,1% trong nước: acetonitril, và chế độ chạy gradient nồng độ A:B (95:5,v/v); 20-30 phút: A:B (90:10,v/v), kết quả thu được là peak của CAF và peak của 5-caffeoylquinic đã tách được hoàn toàn (Hình 2). Khi tiến hành thẩm định điều kiện sắc ký đã lựa chọn, kết quả cho thấy tất cả các tiêu chí đều đạt yêu cầu. Áp dụng để xác định hàm lượng CGA và CAF trong hạt cà phê thu hái tại huyện Ea Kar cho thấy, đồng phân 5-caffeoylquinic vẫn là chất chiếm hàm lượng cao nhất (83,88%) trong tổng hàm lượng CGA. Hàm lượng CGA và CAF trong cà phê robusta cao hơn so với cà phê arabica. Kết quả định lượng CGA trong mẫu cà phê của chúng tôi cũng tương đồng so với hàm lượng mà tác giả Đỗ Thị Thanh Huyền đã công bố [8].

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được quy trình định lượng đồng thời CGA và CAF trong hạt cà phê. Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp. Kết quả nghiên cứu góp phần ứng dụng để định lượng đồng thời CGA và CAF trong hạt cà phê, cũng như cung cấp cơ sở để phát triển phương pháp định lượng cho một số chế phẩm trên thị trường có nguồn gốc từ cà phê.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] V. C. Vo, *Dictionary of Medicinal Plants in Vietnam*. Medical Publishing House, Ha Noi, 1997, pp. 292-294
- [2] V. Pimpley, S. Patil, K. Srinivasan *et al.*, "The chemistry of chlorogenic acid from green coffee and its role in attenuation of obesity and diabetes," *Prep Biochem Biotechnol*, vol. 50, no. 4, pp. 969-978, 2020.
- [3] M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas *et al.*, "Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research," *Biomed Pharmacother*, no. 97, pp. 67-74, 2018.
- [4] H. Roshan, O. Nikpayam, M. Sedaghat *et al.*, "Effects of green coffee extract supplementation on anthropometric indices, glycaemic control, blood pressure, lipid profile, insulin resistance and appetite in patients with the metabolic syndrome: a randomised clinical trial," *Br J Nutr*, vol. 119, no. 3, pp. 250-258, 2018.
- [5] A. Gupta, A. G. Atanasov, Y. Li *et al.*, "Chlorogenic acid for cancer prevention and therapy: Current status on efficacy and mechanisms of action," *Pharmacol Res*, vol. 186, 2022, Art. no. 106505.
- [6] V. P. Nguyen, "Applying new technology to produce functional foods from green coffee beans," *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, no. 4A, pp. 31-33, 2022.
- [7] T. A. N. Nguyen, P. K. T. Le, and D. P. Pham, "Separation and characterisation of standard chlorogenic acid," *Journal of Pharmacy*, vol. 56, no. 11, pp. 22-27, 2016.
- [8] T. T. H. Do, "Study on technology to extract chlorogenic acid (CGAs) from green coffee beans meeting export standards as materials for health protection products to prevention and treatment of metabolic syndromes," (in Vietnamese), Independent project of Vietnam Academy of Science and Technology, Institute of Natural Products Chemistry, 2021.
- [9] G. Navarra, M. Moschetti, V. Guarrasi *et al.*, "Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy," *Journal of Chemistry*, vol. 2017, 2017, Art. no. 6435086.

-
- [10] M.S. Adisya, C. S. Fadlina, and M. Abdul, "Simultaneously Extraction of Caffeine and Chlorogenic Acid from *Coffea canephora* Bean using Natural Deep Eutectic Solvent-Based Ultrasonic Assisted Extraction," *Pharmacogn J*, vol. 11, no. 2, pp. 267-271, 2019.
- [11] ICH, *Harmonised Tripartite Guideline: Guidelines for validation of analytical procedures: Q2 (R1). Text and Methodology*, 2005.
- [12] AOAC, *Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Section 3.4.1- 3.4.2*, pp. 8-9, 2013.
- [13] H. C. Bui and B. L. Vu, "Quantification of chlorogenic acid in Toa Sang extraction by high performance liquid chromatography," *Journal of Pharmacy*, vol. 59, no. 12, pp. 13-16, 2019.
- [14] T. M. Nguyen and T. K. A. Nguyen, "Development and validation of a method for the quantification of chlorogenic acid in liver tonic capsule by high performance liquid chromatography," *Journal of Pharmacy*, vol. 58, no. 4, pp. 36-39, 2019.
- [15] S. Awwad, R. Issa, L. Alnsour, *et al.*, "Quantification of Caffeine and Chlorogenic Acid in Green and Roasted Coffee Samples Using HPLC-DAD and Evaluation of the Effect of Degree of Roasting on Their Levels," *Molecules*, vol. 26, no. 24, 2021, Art. no. 7502.
- [16] J. S. Eon, H. T. Kim, I. H. Jeong, *et al.*, "Contents of chlorogenic acids and caffeine in various coffee-related products," *J Adv Res*, vol. 17, pp. 85-94, 2019.
- [17] J. A. Vinson, X. Chen, and D. D. Garver, "Determination of Total Chlorogenic Acids in Commercial Green Coffee Extracts," *J Med Food*, vol. 22, no. 3, pp. 314-320, 2019.
- [18] P. K. Yılmaz and U. Kolak, "SPE-HPLC Determination of Chlorogenic and Phenolic Acids in Coffee," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 55, no. 7, pp. 712-718, 2017.
- [19] J. Heo, K. Adhikari, K. S. Choi, *et al.*, "Analysis of Caffeine, Chlorogenic Acid, Trigonelline, and Volatile Compounds in Cold Brew Coffee Using High-Performance Liquid Chromatography and Solid-Phase Microextraction—Gas Chromatography-Mass Spectrometry," *Foods*, vol. 9, no. 12, 2020, Art. no. 1746.
- [20] T. K. Le, T. T. H. Hoang, A. V. Ha, *et al.*, "Studying extraction conditions of acid chlorogenic and effect of reducing triglyceride of green coffee bean extract," *Vietnam National Conference on Biotechnology*, 2020, pp. 792-798.