

MOLECULAR ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINING TOTAL POLYPHENOL CONTENTS IN ROASTED GROUND COFFEE PRODUCTS

Nguyen Thanh Nho, Le Thi Anh Dao, Nguyen Thi Kim Chi, Nguyen Cong Hau*

Nguyen Tat Thanh University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 22/8/2021</p> <p>Revised: 09/11/2021</p> <p>Published: 10/11/2021</p>	<p>Coffee has been considered among the most common non-alcoholic beverages consumed globally due to its attractive taste and health benefits for drinkers. The total polyphenol contents (TPCs, calculated as milligram gallic acid equivalent per one gram of sample, mg GAE g⁻¹) could be used as a simple criterion to evaluate the variations in chemical constituents and antioxidant capacities in roasted ground coffee products due to the differences in varieties and roasting degrees. This study aimed to investigate the effects of several important parameters, including extraction time, extraction ratios, extraction circles with/without ultrasound-assisted, during the extraction procedure based on ISO 14502-1:2005 to determine TPCs. The results showed the most effective extraction procedure employed 10.00 mL of 70% v/v methanol as the extraction solvent for 0.2000 g of coffee sample and double extraction (20 minutes for each extraction circle) in a water bath at 70°C without ultrasound-assisted. The calibration graph was built from 10.0 to 70.0 mg GAE L⁻¹, R² = 0.9996. The repeatability, reproducibility, and recoveries were in accordance with Appendix F. AOAC (2016). Robusta samples exhibited higher TPCs than Arabica (37.27-48.23 mg GAE g⁻¹ vs. 29.07-40.54 mg GAE g⁻¹).</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Coffee</p> <p>TPCs</p> <p>Roasting degrees</p> <p>Robusta</p> <p>Arabica</p>	

PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG TRONG SẢN PHẨM CÀ PHÊ RANG XAY

Nguyễn Thành Nho, Lê Thị Anh Đào, Nguyễn Thị Kim Chi, Nguyễn Công Hậu*

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 22/8/2021</p> <p>Ngày hoàn thiện: 09/11/2021</p> <p>Ngày đăng: 10/11/2021</p>	<p>Cà phê được xem là một trong những thức uống không cồn phổ biến nhất trên thế giới do hương vị cũng như lợi ích sức khỏe cho người dùng. Polyphenol tổng (TPCs, tính theo miligam đương lượng của axit gallic trên 1 gam mẫu, mg GAE g⁻¹) là một chỉ tiêu đơn giản giúp đánh giá sự khác biệt về thành phần hóa học và hoạt tính kháng oxy hóa trong sản phẩm cà phê rang xay do sự đa dạng về giống cũng như chế độ rang. Nghiên cứu này khảo sát các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình chiết mẫu phân tích TPCs dựa trên ISO 14502-1:2005, gồm thời gian chiết, tỷ lệ chiết, số lần chiết và kỹ thuật chiết ủ nhiệt có và không có sự hỗ trợ của siêu âm. Kết quả cho thấy quy trình chiết hiệu quả khi sử dụng 10,00 mL dung môi metanol 70% v/v cho 0,2000 g mẫu, ủ nhiệt không siêu âm ở 70°C với 2 lần chiết (20 phút/lần). Đường chuẩn được xây dựng từ 10,0 đến 70,0 mg GAE L⁻¹, R² = 0,9996, độ lặp, độ tái lập và hiệu suất thu hồi đáp ứng yêu cầu của Phụ lục F trong AOAC (2016). Sản phẩm cà phê Robusta có TPCs cao hơn Arabica (37,27-48,23 mg GAE g⁻¹ so với 29,07-40,54 mg GAE g⁻¹).</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Cà phê</p> <p>TPCs</p> <p>Chế độ rang</p> <p>Robusta</p> <p>Arabica</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4910>

* Corresponding author. Email: nchau@ntt.edu.vn

1. Giới thiệu

Cà phê được xem là một trong những loại thức uống không cồn phổ biến được sử dụng hàng ngày trên thế giới do hương vị đặc trưng và tác dụng làm cho tinh thần tỉnh táo mà cà phê có thể mang lại cho người dùng. Theo nghiên cứu của Sridevi và các cộng sự vào năm 2011 cho thấy, khoảng 80% dân số trưởng thành đang sử dụng cà phê làm thức uống [1]. Arabica và Robusta là hai giống cà phê phổ biến trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Trong đó, Coffea Arabica chiếm khoảng 75% và Coffea Robusta hay Coffea Canephora chiếm khoảng 25% về mức độ phổ biến [2]. Ngoài ra, tùy vào điều kiện chế biến có thể chia cà phê thành bốn loại ứng với các chế độ rang khác nhau như rang nhẹ, trung bình, trung bình đậm và đậm [3]. Đối với chế độ rang nhẹ (light roasting), quá trình rang sẽ kết thúc sớm khi hạt cà phê phát ra tiếng nổ đầu tiên trong khoảng nhiệt độ từ 195 đến 205°C, mẻ rang sẽ được lấy ra ngay. Rang trung bình (medium roasting) là giai đoạn thứ hai, giữa hai lần nổ của cà phê, mẻ rang sẽ được lấy ra trước khi tiếng nổ thứ hai phát ra, lúc này nhiệt độ đạt khoảng 210 đến 220°C. Nếu để tiếng nổ thứ hai phát ở nhiệt độ từ 225 đến 230°C thì hạt cà phê đã được rang ở chế độ trung bình đậm (medium-dark roasting). Ở giai đoạn cà phê rang đậm (dark roasting), là cà phê rang xuất hiện tiếng nổ lần thứ 2 khoảng 30 đến 60 giây khi đã đạt nhiệt độ trên 250°C sẽ được đưa ra khỏi máy rang. Bên cạnh những thay đổi về hương vị do khác biệt về giống hay chế độ rang, sự thay đổi về thành phần nội chất rất được quan tâm nghiên cứu. Mặc dù cafein được quan tâm nhiều nhất, nhưng cà phê là một hỗn hợp phức tạp của nhiều hợp chất hóa học, bao gồm cacbohydrat, lipid (chất béo), các axit amin, vitamin, khoáng chất, ancaloit và các hợp chất thuộc nhóm phenolic [4]. Trong thành phần hóa học, các hợp chất phenolic là một hỗn hợp gồm các hydrocacbon thơm có cấu trúc vòng giống như cấu trúc của benzen mà axit chlorogenic là thành phần chính trong hạt cà phê với hàm lượng lên đến 12% chất khô [5]. Các nghiên cứu đã cho thấy axit chlorogenic tạo nên khả năng kháng oxy hóa cho cà phê [6]. Vì vậy, hàm lượng polyphenol tổng (total polyphenol contents-TPCs) trong các loại cà phê nói riêng và trong nhiều nền mẫu khác nói chung được xem là một trong những chỉ tiêu đơn giản và đầu tiên dùng để đánh giá chung khả năng kháng oxy hóa. Nghiên cứu của Hečimović và các cộng sự được thực hiện vào năm 2011 trên các loại cà phê nổi tiếng như Minas, Cioccolato (Coffea Arabica) và Cherry, Vietnam (Coffea Robusta) được rang ở các chế độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cà phê Cherry có TPCs cao nhất với 42,37 mg GAE g⁻¹ và thấp nhất là Cioccolato với 33,12 mg GAE g⁻¹ [2]. Nghiên cứu của Matúš Várady (năm 2020) được tiến hành trên hạt cà phê nhân trái qua bốn chế độ rang khác nhau với giá trị TPCs dao động trong khoảng từ 32,0 đến 46,8 mg GAE g⁻¹ [7].

Trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ tiến hành khảo sát các điều kiện chiết mẫu bao gồm thời gian chiết, tỷ lệ chiết và số lần chiết lặp sử dụng dung môi chiết metanol 70% v/v trong điều kiện ủ nhiệt ở 70°C có và không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm, nhằm phát triển một phương pháp xác định hàm lượng polyphenol tổng (TPCs) trong cà phê với thuốc thử Folin-Ciocalteu theo ISO 14502-1:2005 áp dụng cho trà [8]. Dựa trên các điều kiện khảo sát, quy trình phân tích sẽ được đánh giá theo tiêu chí trong Phụ lục F của AOAC (2016) [9] và áp dụng trên một số mẫu cà phê thực tế ở những điều kiện rang khác nhau (rang nhẹ, trung bình và đậm).

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất

Chất chuẩn axit gallic monohydrat, C₆H₂(OH)₃COOH.H₂O (GA, độ tinh khiết ≥ 99%), hãng Merck (Đức) được sử dụng để pha chế dung dịch gốc có nồng độ 1000 mg L⁻¹ tính theo đương lượng gam của axit gallic (1000 mg GAE L⁻¹). Cân chính xác khoảng 0,0550 g axit gallic ngâm một phân tử nước cho vào bình định mức loại 50 mL, sau đó thêm nước khử ion đến vạch, bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong điều kiện tránh ánh sáng, sử dụng trong ngày. Các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 và 70,0 mg GAE L⁻¹ được chuẩn bị mỗi ngày trước khi sử dụng bằng cách pha loãng dung dịch gốc 1000 mg L⁻¹ trong nước khử ion. Các hóa

chất và thuốc thử khác đều thuộc loại tinh khiết phân tích (TKPT), mua từ hãng Merck (Đức) bao gồm dung môi metanol (MeOH, CH₃OH), Na₂CO₃ khan, thuốc thử Folin–Ciocalteu (nồng độ 2 N). Dung môi chiết mẫu MeOH 70% (v/v) được chuẩn bị bằng cách pha loãng theo thể tích trong nước khử ion. Dung dịch Na₂CO₃ 7,5% (w/v) được pha bằng cách cân khoảng 7,50 g muối Na₂CO₃ khan (dạng không ngậm nước), hòa tan, chuyển vào bình định mức 100 mL và định mức đến vạch bằng nước khử ion. Thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% (v/v) được pha loãng bằng cách rút 10,00 mL dung dịch Folin-Ciocalteu thương mại 2 N trong 100 mL nước khử ion.

2.2. Dụng cụ và thiết bị

Cân phân tích có độ chính xác 0,0001 g (Sartorius, Germany) được sử dụng để cân chất chuẩn, các loại hoá chất và cân mẫu cà phê. Thiết bị siêu âm, đáp ứng ở điều kiện 70°C (Bandelin Sonorex Super RK 1028 CH, Đức) và bể ủ nhiệt (Mettmert, Đức) được sử dụng trong quá trình chiết mẫu. Máy ly tâm (Kubota model 4000, Nhật Bản), đáp ứng ở điều kiện 4500 vòng phút⁻¹. Máy vortex (VELP Scientifica, Ý) được sử dụng để trộn mẫu và dung môi chiết. Thiết bị quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis Shimadzu 1800 của Nhật Bản được dùng để đo mẫu, sử dụng phần mềm điều khiển UVProbe 2.34.

Các dụng cụ micropipet có dung lượng 100 µL - 1000 µL, 1,00 mL - 5,00 mL và 1,00 mL - 10,00 mL (Mettler Toledo, USA) được dùng để rút chính xác thể tích dung dịch chuẩn và tác chất. Màng lọc polytetrafluoroetylen (PTFE) 0,45 µL của IsoLab (Đức). Ống ly tâm nhựa polypropylen 15 mL (Biologix, USA) được sử dụng trong quá trình chiết các mẫu cà phê.

Một số dụng cụ thủy tinh khác như bình định mức các loại 10, 50 và 100 mL (IsoLab, Đức); cốc thủy tinh 100 mL và 250 mL (IsoLab, Đức); ống đong 500 mL (IsoLab, Đức); pipet thẳng thủy tinh có chia vạch loại 5,00 và 10,00 mL (loại A, Duran, Đức).

2.3. Thông tin mẫu

Trong nghiên cứu này, 6 mẫu cà phê thuộc hai giống là Arabica và Robusta được mua từ nông trại Cầu Đất, thôn Xuân Thọ, xã Xuân Trường, ngoại thành Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Mỗi giống cà phê được rang ở ba chế độ khác nhau bao gồm rang nhẹ (light roasting), rang trung bình (medium roasting) và rang đậm (dark roasting). Trong quá trình rang, hạt cà phê được rang ở nhiệt độ trong khoảng từ 200 đến 240°C trong 10-15 phút. Chế độ rang của cà phê sẽ được đánh giá chủ yếu thông qua việc quan sát màu sắc của người sản xuất trong quá trình rang [10], [11]. Thông tin mẫu được trình bày trong Bảng 1. Các mẫu cà phê sau khi rang, xay, được chứa trong túi nhôm - polypropylen-polyetylen kín có nút chân không, được bảo quản trong điều kiện tránh ánh sáng, nhiệt độ 25°C và độ ẩm 70% tại phòng thí nghiệm cho đến khi thực hiện quá trình phân tích.

Bảng 1. Thông tin mẫu nghiên cứu

Giống cà phê	Chế độ rang	Mã mẫu
Arabica	Dark, Medium, Light	Arabica-Dark, Arabica-Medium, Arabica-Light
Robusta	Dark, Medium, Light	Robusta-Dark, Robusta-Medium, Robusta-Light

2.4. Khảo sát quy trình chiết mẫu phân tích polyphenol tổng trong cà phê

Quy trình chiết mẫu phân tích hàm lượng polyphenol tổng trong cà phê được tham khảo từ ISO 14502-1:2005 [8] với một số thay đổi: (a) Cân 0,2000 (±0,0001) g mẫu vào ống ly tâm nhựa polypropylen 15 mL; (b) Thêm tiếp 10,00 mL dung môi chiết là MeOH 70% v/v; (c) Vortex hỗn hợp trong 1 phút và cho vào bể ủ nhiệt ở 70°C trong 20 phút; (d) Ly tâm với tốc độ 4000 vòng phút⁻¹ trong 5 phút và gạn thu lấy dịch chiết vào bình định mức loại 50 mL; (e) Chiết lại bã rắn (thực hiện như bước b đến d); (f) Gộp dịch chiết ở hai lần thực hiện và thêm nước khử ion đến vạch mức; (g) Lọc dung dịch mẫu qua màng PTFE 0,45 µm, chuẩn bị tiếp cho bước pha loãng và lên màu với thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% v/v.

Quy trình chiết phân tích hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu cà phê được tham khảo từ quy trình chiết dành cho nền mẫu trà. Do đó, khi áp dụng cho nền mẫu cà phê, một số nhân tố

trong quy trình chiết từ bước (c) đến bước (e) sẽ được đánh giá nhằm thu được hiệu quả chiết tốt nhất và chiết định lượng chất phân tích trong mẫu. Các khảo sát này được thực hiện trên hai mẫu đại diện cho hai loại cà phê ở chế độ rang đậm là Arabica-Dark và Robusta-Dark. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cố định nhân tố về khối lượng cân mẫu và loại dung môi chiết mẫu là MeOH 70%. Các nhân tố khảo sát bao gồm: (i) thời gian chiết mẫu (5, 10, 15, 20, 25 và 30 phút); (ii) so sánh điều kiện chiết ở nhiệt độ 70°C có và không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm và (iii) tỷ lệ chiết (gam mẫu : mL dung môi chiết) kết hợp với thay đổi về số lần tái chiết (chiết lặp lại) bao gồm các điều kiện sau: 0,20:10,00 (g/mL) và chiết một lần; 0,20:10,00 (g/mL) và chiết hai lần; 0,20:5,00 (g/mL) và chiết hai lần.

Dịch chiết được pha loãng 10 lần với nước khử ion và thực hiện quy trình lên màu xác định hàm lượng polyphenol tổng. Quá trình lên màu được thực hiện dựa theo ISO 14502-1:2005 [8]: Lấy 1,00 mL dung dịch mẫu đã pha loãng được phản ứng với 5,00 mL thuốc thử Folin 10% (v/v) trong 5-8 phút; sau đó, thêm tiếp 4,00 mL Na₂CO₃ 7,5% (w/v) và đợi trong 60 phút trước khi đo quang ở bước sóng hấp thụ cực đại của phức tạo thành là 765 nm.

$$TPCs = \frac{C \times 10 \times 50 \times 100}{1000 \times m \times (100 - H)} = \frac{C \times 50}{m \times (100 - H)}$$

Trong đó:

- TPCs: hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu cà phê, tính trên khối lượng khô (đơn vị là mg GAE g⁻¹);
- C: nồng độ polyphenol tổng tính ra từ đường chuẩn (đơn vị là mg GAE L⁻¹);
- m: khối lượng cân chính xác của mẫu cà phê mang đi chiết (đơn vị là g);
- H: độ ẩm của mẫu cà phê (tính theo %).

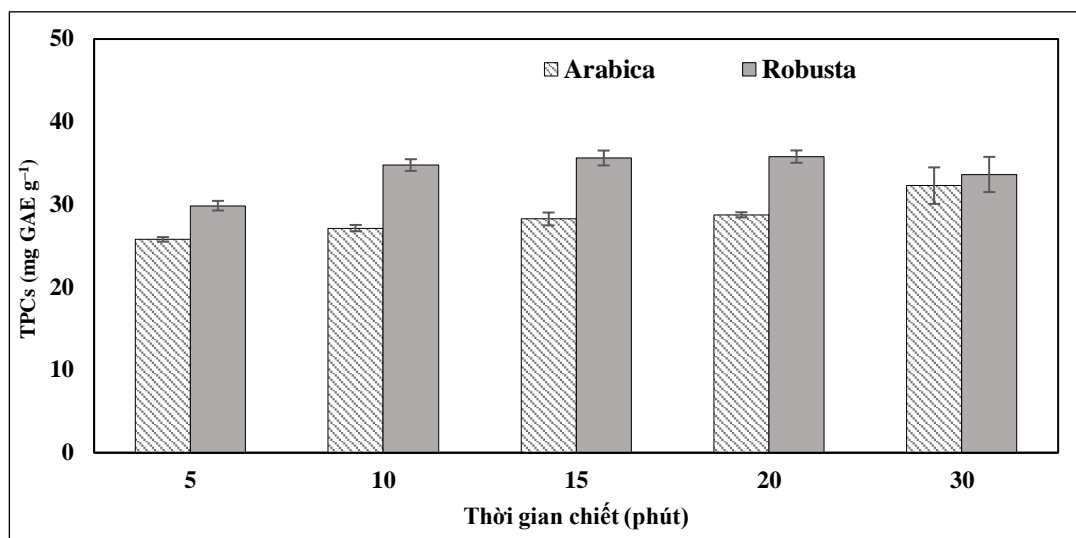
2.5. Đánh giá phương pháp và áp dụng phân tích hàm lượng polyphenol tổng trên mẫu cà phê

Phân tích hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu cà phê dựa trên kỹ thuật quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis được đánh giá dựa trên hướng dẫn trong tài liệu “Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật” của Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia [12]. Việc đánh giá phương pháp bao gồm các yếu tố: giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng (LOD và LOQ); đường chuẩn tuyến tính dạng $y = ax + b$; độ lặp lại và độ tái lặp; độ đúng thông qua thí nghiệm đánh giá hiệu suất thu hồi. LOD được tính bằng cách thực hiện phân tích 11 mẫu blank riêng biệt, sau đó tính toán hàm lượng polyphenol tổng trung bình (\bar{X}) và độ lệch chuẩn (SD): $LOD = \bar{X} + 3SD$ và $LOQ = \bar{X} + 10SD$. Đường chuẩn được xây dựng dựa trên quan hệ tuyến tính giữa nồng độ của các dung dịch chuẩn và độ hấp thụ tại 765 nm trong khoảng từ 10,0 đến 70,0 mg GAE L⁻¹. Độ lặp lại của phương pháp được tính toán dựa trên giá trị độ lệch chuẩn tương đối (%RSD_r) đối với mẫu cà phê Arabica-Dark khi thực hiện lặp lại 6 lần (n = 6). Đối với độ tái lặp, chúng tôi tiến hành phân tích mẫu cà phê Arabica-Dark trong 3 ngày khác nhau; sau đó, dùng ANOVA một yếu tố để tính toán giá trị %RSD_R. Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn vào mẫu Arabica-Dark ở ba mức nồng độ 0,5C_x, C_x và 1,5C_x (C_x là nồng độ polyphenol tổng trung bình trong mẫu) tương ứng với các nồng độ 18, 35 và 53 mg GAE g⁻¹. Các tiêu chí trong quá trình đánh giá phương pháp sẽ dựa trên Phụ lục F của AOAC (2016) [9].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol tổng

Quy trình chiết phân tích hàm lượng polyphenol tổng trong cà phê được thực hiện dựa theo ISO 14502-1:2005 [8]. Trong quy trình này, nhiệt độ và thời gian là nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến điều kiện chiết mẫu. Tuy nhiên, dung môi chiết chứa đến 70% là metanol trong nước có nhiệt độ sôi thấp nên chúng tôi giữ nhiệt độ chiết là 70°C để hạn chế sự bay hơi trong quá trình chiết, dẫn đến ảnh hưởng về tỷ lệ chiết mẫu. Chúng tôi chỉ tiến hành khảo sát thời gian chiết (5, 10, 15, 20, 25 và 30 phút). Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian chiết mẫu đến hàm lượng polyphenol tổng trong dịch chiết

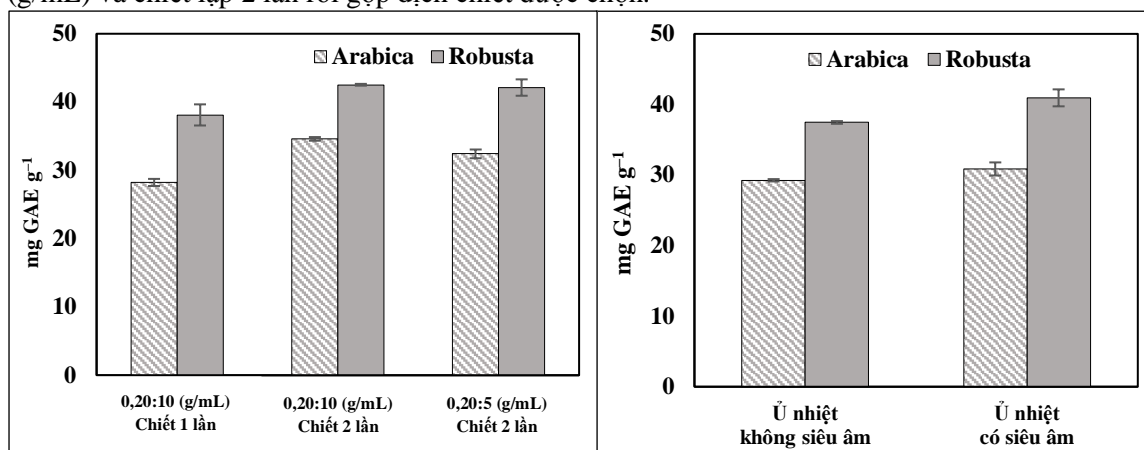
Từ Hình 1, có thể thấy hàm lượng polyphenol tổng số được chiết có xu hướng tăng dần và đạt giá trị cao nhất ở 20 phút (35,79 mg GAE g⁻¹ đối với cà phê Robusta) và 30 phút (32,28 mg GAE g⁻¹ đối với cà phê Arabica). Mặc dù, với mẫu Arabica, thời gian chiết mẫu 30 phút cho hàm lượng polyphenol tổng cao nhất nhưng độ lặp lại kém hơn so với thời gian chiết 20 phút (%RSD lần lượt là 6,8 và 1,1%). Bên cạnh đó, sự chênh lệch về hàm lượng polyphenol tổng giữa 30 phút và 20 phút không nhiều (3,53 mg GAE g⁻¹). Sự gia tăng về hàm lượng polyphenol tổng trong dịch chiết khi tăng thời gian chiết mẫu có thể được giải thích dựa trên cân bằng về phân bố của chất phân tích giữa nền mẫu cà phê (pha rắn) và dịch chiết (pha lỏng) theo thời gian, trong đó dưới tác dụng bởi ái lực của dung môi với chất phân tích và nhiệt 70°C, các hợp chất polyphenol phân bố từ pha rắn ban đầu (cà phê) vào trong dịch chiết tăng khi thời gian chiết tăng. Tuy nhiên, nếu kéo dài thời gian chiết mẫu quá lâu có thể dẫn đến sự suy giảm hàm lượng chất phân tích trong dịch chiết do sự phân hủy nhiệt của các hợp chất polyphenol dưới sự ảnh hưởng của nhiệt độ theo thời gian [11], [13], [14]. Ở đây có thể thấy sự giảm hàm lượng polyphenol tổng của mẫu Robusta khi kéo dài thời gian chiết đến 30 phút và độ lặp kém của kết quả do quá trình phân hủy diễn ra ở mỗi lần thực hiện có thể không tương đồng nhau. Trong quá trình phân tích mẫu, chúng ta có thể chọn thời gian chiết không quá dài và tái chiết để đảm bảo cho việc chiết định lượng phân tích. Do đó, để đảm bảo về độ lặp lại của phương pháp và thuận tiện trong việc phân tích hàng loạt mẫu, có thể chọn thời gian chiết mẫu là 20 phút cho cả hai loại mẫu Robusta và Arabica.

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ chiết và số lần chiết

Theo quy trình được trình bày trong ISO 14502-1:2005 [8], tỷ lệ chiết được giữ là 0,20:5,00 (g/mL) và thực hiện chiết hai lần. Trong nghiên cứu này, để áp dụng tốt cho nền mẫu cà phê, tỷ lệ chiết và số lần chiết sẽ được khảo sát. Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ chiết và số lần chiết đến hàm lượng polyphenol tổng trong dịch chiết được trình bày trong Hình 2.

Kết quả ở Hình 2 cho thấy tỷ lệ chiết 0,20:10 (g/mL) và chiết 1 lần cho hàm lượng polyphenol tổng trong dịch chiết thấp nhất cho cả hai mẫu khảo sát (28,23 ± 0,52 và 38,1 ± 1,5 mg GAE g⁻¹ lần lượt cho mẫu Arabica và Robusta). Tuy nhiên, nếu giữ nguyên tỷ lệ chiết này và thực hiện tái chiết lại phân bã rắn (chiết lần hai) thì sẽ thu được hàm lượng polyphenol tổng trong các dịch chiết cao nhất (34,61 ± 0,27 và 42,53 ± 0,13 mg GAE g⁻¹ lần lượt cho mẫu Arabica và Robusta). Trong khi đó, nếu vẫn thực hiện chiết 2 lần và thay đổi tỷ lệ chiết 0,20:5 (g/mL) thì hàm lượng polyphenol trong dịch chiết không thay đổi nhiều so với 0,20:10 (g/mL) nhưng cho độ lặp lại kém hơn với %RSD lần lượt là 2,0-2,9% cho tỷ lệ chiết 0,20:5 (g/mL) và 0,31-0,77% cho tỷ lệ chiết 0,20:10 (g/mL). Nguyên nhân có thể được giải thích do tỷ lệ chiết 0,20:5 (g/mL) với hai lần

chiết chưa đủ để tạo cân bằng tốt của chất phân tích giữa pha rắn và dung môi, dẫn đến vẫn còn một lượng chất phân tích chưa được chiết vào trong dịch chiết, dẫn đến kết quả thấp hơn so với tỷ lệ 0,20:10 (g/mL) với cùng số lần chiết. Thêm vào đó, việc sử dụng một lượng ít dung môi chiết (trường hợp sử dụng 5 mL thay vì 10 mL) dẫn đến khó khăn trong quá trình gạn thu dung dịch sau chiết, gây ra khả năng mất chất phân tích do gạn chưa hết hoặc nguy cơ mất mẫu do thao tác. Như vậy, để đảm bảo hiệu quả chiết tốt nhất, trong nghiên cứu này, điều kiện tỷ lệ chiết 0,20:10 (g/mL) và chiết lặp 2 lần rồi gộp dịch chiết được chọn.



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ chiết và số lần chiết (trái) và điều kiện chiết (phải) đến hàm lượng polyphenol tổng trong dịch chiết

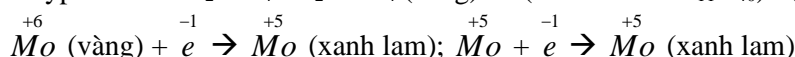
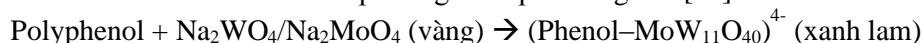
3.3. So sánh điều kiện chiết ủ nhiệt có và không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm

Trong các nhân tố có ảnh hưởng tới hiệu quả chiết, năng lượng hỗ trợ quá trình chiết được xem là một yếu tố quan trọng. Ở nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện so sánh điều kiện chiết ủ nhiệt tại 70°C có và không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm nhằm tìm ra điều kiện chiết hiệu quả nhất cho nền mẫu cà phê. Kết quả của khảo sát này được trình bày ở Hình 2.

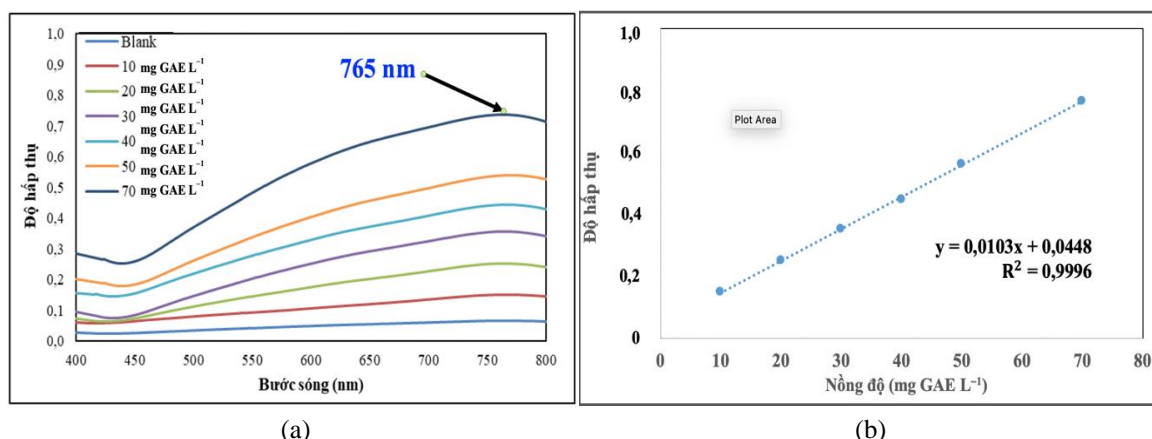
Từ Hình 2 có thể thấy rằng, khi có sự hỗ trợ của sóng siêu âm hàm lượng polyphenol tổng chiết được cao hơn (30,86-40,93 so với 29,25-37,45 mg GAE g⁻¹) nhưng có độ lặp lại kém so với sử dụng bể ủ nhiệt (%RSD lần lượt là 1,2-2,9 và 0,51-0,57%). Sóng siêu âm có tác động mạnh mẽ hơn so với chỉ sử dụng nhiệt độ của bể ủ nhiệt giúp tăng hiệu suất chiết. Tuy nhiên, năng lượng của sóng siêu âm đã phá vỡ cấu trúc mẫu dẫn đến quá trình ly tâm và gạn dung dịch trở nên khó khăn. Bên cạnh đó, quá trình phân hủy các hợp chất khi tác động một năng lượng lớn dẫn đến quá trình chiết và phân hủy chất phân tích diễn ra liên tục. Từ những lý do nêu trên đã dẫn đến sự bất ổn của kết quả. Vì vậy, để đảm bảo cả hai tiêu chí là quá trình chiết mẫu diễn ra với hiệu suất cao và đạt được sự ổn định chúng tôi sẽ chỉ chiết ủ nhiệt không có sóng siêu âm.

3.4. Thẩm định phương pháp phân tích polyphenol tổng trong mẫu cà phê

Thành phần polyphenol tổng trong mẫu cà phê được chiết bằng kỹ thuật chiết ủ nhiệt ở 70°C sử dụng dung môi chiết là MeOH 70% v/v, theo quy trình chiết được khảo sát và tối ưu dựa trên ISO-14502-1:2005 [8]. Phức chất hình thành giữa các hợp chất polyphenol với thuốc thử Folin-Ciocalteu có màu xanh lam theo phương trình phản ứng sau [15]:



Quá trình định lượng được thực hiện dựa trên việc đo độ hấp thụ của phức hình thành tại bước sóng hấp thụ cực đại là 765 nm (Hình 3a). Phương pháp phân tích được đánh giá trước khi áp dụng vào phân tích mẫu cà phê thực tế. Phương pháp phân tích có LOD và LOQ thấp (lần lượt là 4,4 và 13,2 mg GAE L⁻¹), đáp ứng tốt nồng độ thực tế của polyphenol tổng trong mẫu cà phê.

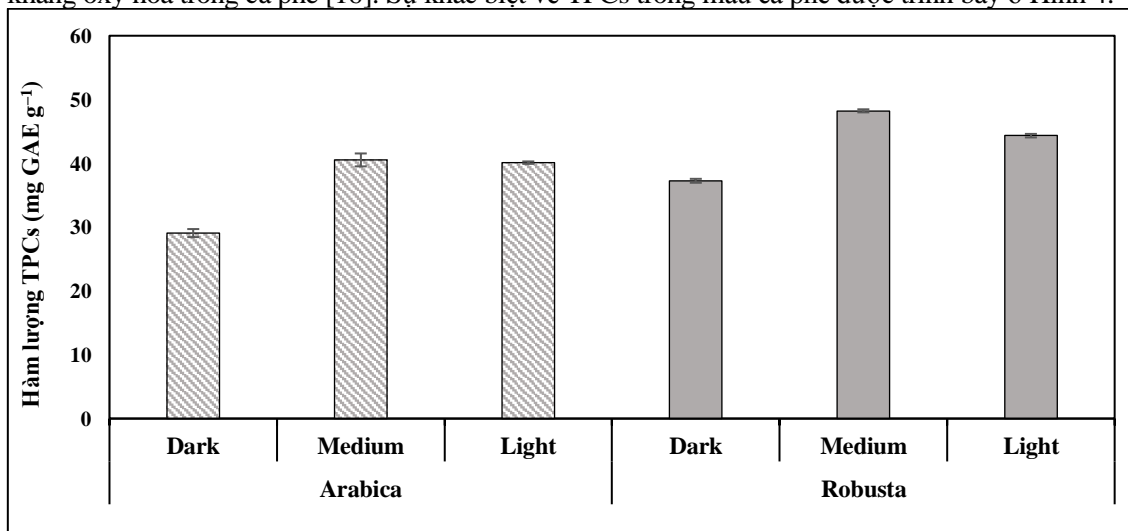


Hình 3. (a) Phổ hấp thụ của phức chất tạo thành trong khoảng từ 400 đến 800 nm và (b) đường chuẩn của axit gallic tại bước sóng hấp thụ cực đại 765 nm

Đường chuẩn $y = 0,0103x + 0,0448$ được xây dựng từ gần LOQ ($10,0 \text{ mg GAE L}^{-1}$) đến $70,0 \text{ mg GAE L}^{-1}$ (Hình 3b) có độ tuyến tính tốt theo yêu cầu trong Phụ lục F của AOAC dành cho đường chuẩn tuyến tính ($R^2 = 0,9996 > 0,9950$) [9]. Sau khi xây dựng đường chuẩn, tín hiệu của chính các điểm chuẩn được thay vào đường chuẩn để tính toán độ chệch (% bias). Độ lớn về độ chệch của các điểm chuẩn dao động từ 0,10 đến 2,2%, đáp ứng yêu cầu dưới 15% theo hướng dẫn trong tài liệu “Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật” [12]. Độ lặp lại ($RSD_r = 1,7\%$), độ tái lặp ($RSD_R = 1,8\%$) và hiệu suất thu hồi (99,1-100%) phù hợp với yêu cầu cho phép của AOAC ở mức nồng độ của chất phân tích 1-10% [9]. Do đó, phương pháp phân tích này có thể đáp ứng trong việc phân tích hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu cà phê thực tế, đảm bảo độ tin cậy và độ chính xác của kết quả.

3.5. Đánh giá hàm lượng polyphenol tổng trong các mẫu cà phê

Hàm lượng polyphenol tổng (TPCs) là một trong những cách đơn giản để đánh giá khả năng kháng oxy hóa trong cà phê [16]. Sự khác biệt về TPCs trong mẫu cà phê được trình bày ở Hình 4.



Hình 4. Hàm lượng polyphenol tổng số trong một số loại cà phê

Từ đồ thị Hình 4 có thể nhận thấy, mẫu Arabica-Dark có hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất ($29,07 \pm 0,63 \text{ mg GAE g}^{-1}$), mẫu Robusta-Medium cao nhất ($48,23 \pm 0,24 \text{ mg GAE g}^{-1}$). Một cách tổng thể, các mẫu cà phê Robusta có hàm lượng polyphenol tổng số cao hơn so với mẫu cà phê Arabica ở cùng chế độ rang. Các mẫu cà phê Robusta có kết quả dao động trong

khoảng từ $37,27 \pm 0,31$ mg GAE g^{-1} đến $48,23 \pm 0,24$ mg GAE g^{-1} ; trong khi các mẫu Arabica là từ $29,07 \pm 0,63$ mg GAE g^{-1} đến $40,50 \pm 1,00$ mg GAE g^{-1} . Xu hướng biến đổi này hoàn toàn phù hợp so với các nghiên cứu trên thế giới về hàm lượng polyphenol tổng số trong các loại cà phê Robusta và Arabica [17], [18]. Kết quả tương tự cũng được báo cáo trong công bố của nhóm tác giả Trandafir (2013) có kết quả trung bình khoảng 40 mg GAE g^{-1} với cà phê Robusta [19]. Nghiên cứu của Sacchetti và các cộng sự vào năm 2009 cho thấy kết quả TPCs của Arabica dao động trong khoảng $2,499 \pm 0,011$ đến $3,876 \pm 0,023$ mg GAE g^{-1} và Robusta dao động trong khoảng $3,655 \pm 0,042$ đến $5,617 \pm 0,010$ mg GAE g^{-1} khi chiết trong nước ở $100^{\circ}C$ trong vòng 10 phút, cho thấy giá trị TPCs thấp hơn so với nghiên cứu hiện tại [20]. Nghiên cứu cho thấy cà phê Robusta có hàm lượng chlorogenic acid cao hơn nhiều so với cà phê Arabica và chính điều này ảnh hưởng đến kết quả polyphenol tổng [21]. Tannin cũng là một trong số những polyphenol chính trong cà phê, hàm lượng tannin trong cà phê Robusta cao gấp khoảng hai lần so với cà phê Arabica [2]. Ngoài ra, chế độ rang ảnh hưởng lớn đến hàm lượng polyphenol đối với cà phê. Đối với cả hai loại cà phê, khi mẫu được rang ở chế độ Medium thì hàm lượng polyphenol tổng số là cao nhất với $40,50 \pm 1,00$ mg GAE g^{-1} (Arabica-Medium) và $48,23 \pm 0,24$ mg GAE g^{-1} (Robusta-Medium). Quá trình chế biến ở nhiệt độ cao trong thời gian dài đã làm phân hủy các hợp chất polyphenol nên các mẫu ở chế độ rang Dark có hàm lượng polyphenol tổng số thấp hơn [22]. Quá trình chế biến đã xảy ra chuỗi phản ứng Maillard hình thành các hợp chất phenolic như hợp chất melanoidin và axit quinic [11], [23]-[25]. Hai quá trình hình thành và mất đi sẽ diễn ra liên tục dẫn đến các mẫu rang ở chế độ Medium có chứa các hợp chất phenolic cao nhất [26]. Tuy nhiên, quá trình sinh ra các hợp chất có tính kháng oxy hoá “mới” có khả năng không thể bù trừ đủ cho quá trình phân hủy các hợp chất kháng oxy hoá “cũ” tồn tại trong cà phê trước khi thực hiện quá trình rang. Do đó, các sản phẩm cà phê ở quá trình rang đậm sẽ có thể cho TPCs thấp hơn những mẫu ở chế độ rang vừa.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã khảo sát và đánh giá ảnh hưởng của một số nhân tố cơ bản trong quá trình chiết mẫu phân tích hàm lượng polyphenol tổng trong 6 mẫu cà phê dựa trên tham khảo từ ISO 14502-1:2005. Quy trình chiết mẫu sử dụng kỹ thuật chiết ở nhiệt độ $70^{\circ}C$, dung môi chiết là metanol 70% và chiết hai lần cho hiệu quả chiết tốt nhất. Phương pháp phân tích sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu và đo độ hấp thụ phân tử tại 765 nm. Đường chuẩn $y = 0,0103x + 0,0448$ cho độ tuyến tính cao ($R^2 = 0,9996$), độ lặp lại, độ tái lập và hiệu suất thu hồi phù hợp với tiêu chí trong Phụ lục F của AOAC (2016). Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng polyphenol tổng có sự khác biệt tùy vào loại cà phê, trong đó mẫu cà phê Robusta có TPCs từ $37,27 \pm 0,31$ mg GAE g^{-1} đến $48,23 \pm 0,24$ mg GAE g^{-1} và cà phê Arabica có TPCs từ $29,07 \pm 0,63$ mg GAE g^{-1} đến $40,50 \pm 1,00$ mg GAE g^{-1}). Bên cạnh đó, chế độ rang cũng ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng, trong đó quá trình rang ở nhiệt độ cao làm phân hủy một số hợp chất phenolic nhưng cũng dẫn đến việc hình thành thêm các chất khác có tính kháng oxy hóa chủ yếu qua phản ứng Maillard, đóng góp vào sự biến động về hàm lượng polyphenol tổng giữa các mẫu. Mẫu rang ở chế độ đậm thường cho giá trị TPCs thấp hơn, có thể do quá trình hình thành ra thêm hợp chất có tính kháng oxy hóa mới không đủ để bù đắp cho việc phân hủy trong trường hợp rang thời gian dài và nhiệt độ cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] V. Sridevi, P. Giridhar, and G. Ravishankar, "Evaluation of Roasting and Brewing effect on Antinutritional Diterpenes-Cafestol and Kahweol in Coffee," *Global Journal of Medical Research*, vol. 11, pp. 1-7, 2011.
- [2] I. Hečimović, A. Belščak-Cvitanović, D. Horžić, and D. Komes, "Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting," *Food chemistry*, vol. 129, pp. 991-1000, 2011.
- [3] A. Cano-Marquina, J. Tarín, and A. Cano, "The impact of coffee on health," *Maturitas*, vol. 75, pp. 7-21, 2013.

- [4] M. A. Spiller, "The chemical components of coffee," *Caffeine*, G. A. Boca Raton: CRC Press, 1998, pp. 97-161.
- [5] C. -L. Ky, J. Louarn, S. Dussert, B. Guyot, S. Hamon, and M. Noiro, "Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions," *Food chemistry*, vol. 75, pp. 223-230, 2001.
- [6] D. P. Moreira, M. C. Monteiro, M. Ribeiro-Alves, C. M. Donangelo, and L. C. Trugo, "Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pp. 1399-1402, 2005.
- [7] M. Várady, T. Hrušková, and P. Popelka, "Effect of preparation method and roasting temperature on total polyphenol content in coffee beverages," *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 38, pp. 417-421, 2020.
- [8] ISO-14502-1, *Determination of substances characteristic of green and black tea*, 2005.
- [9] Appendix F. AOAC, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, 2016.
- [10] I. Andriot, J.-L. Le Quééré, and E. Guichard, "Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity," *Food Chemistry*, vol. 85, pp. 289-294, 2004.
- [11] G. Asfaw and M. Tefera, "Total polyphenol content of green, roasted and cooked Harar and Yirgacheffee Coffee, Ethiopia," *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, vol. 24, pp. 187-192, 2020.
- [12] C. S. Tran, X. D. Pham, T. H. D. Le, and T. T. Nguyen, *Validation in chemical and microbiological analytical methods*, National Institute for Food Control (NIFC), 2010.
- [13] T. Katsube, Y. Tsurunaga, M. Sugiyama, T. Furuno, and Y. Yamasaki, "Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves," *Food Chemistry*, vol. 113, pp. 964-969, 2009.
- [14] J. A. Larrauri, P. Rupérez, and F. Saura-Calixto, "Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 45, pp. 1390-1393, 1997.
- [15] G. A. Agbor, J. A. Vinson, and P. E. Donnelly, "Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay," *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)*, vol. 3, pp. 147-156, 2014.
- [16] J.-G. Xu, Q.-P. Hu, and Y. Liu, "Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 60, pp. 11625-11630, 2012.
- [17] E. Olechno and A. Puścion-Jakubik, "Impact of Brewing Methods on Total Phenolic Content (TPC) in Various Types of Coffee," *Molecules*, vol. 25, p. 5274, 2020.
- [18] C. Perdani and D. Pranowo, "Total phenols content of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) in East Java," *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, p. 012093.
- [19] G. Sacchetti, C. Di Mattia, P. Pittia, and D. Mastrocola, "Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction," *Journal of Food Engineering*, vol. 90, pp. 74-80, 2009.
- [20] I. Trandafir, V. Nour, and M. E. Ionica, "Antioxidant capacity, phenolic acids and caffeine contents of some commercial coffees available on the Romanian market," *Archivos latinoamericanos de nutricion*, vol. 63, p. 87, 2013.
- [21] Y. Narita and K. Inouye, "Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α -amylase isozyme I," *Food Chemistry*, vol. 127, pp. 1532-1539, 2011.
- [22] R. O'Reilly, *Coffee: Botany, biochemistry and production of beans and beverage*, MN Clifford and KC Willson, Ed., Croom Helm, Beckenham, UK, 1985, pp. XIII + 457.
- [23] X. Liu, B. Xia, L. T. Hu, Z. J. Ni, K. Thakur, and Z. J. Wei, "Maillard conjugates and their potential in food and nutritional industries: A review," *Food Frontiers*, vol. 1, pp. 382-397, 2020.
- [24] Y. Liu and D. D. Kitts, "Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews," *Food Research International*, vol. 44, pp. 2418-2424, 2011.
- [25] S. E. Opitz, S. Smrke, B. A. Goodman, M. Keller, S. Schenker, and C. Yeretian, "Antioxidant generation during coffee roasting: A comparison and interpretation from three complementary assays," *Foods*, vol. 3, pp. 586-604, 2014.
- [26] C. Somporn, A. Kamtuo, P. Theerakulpisut, and S. Siriamornpun, "Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor)," *International journal of food science & technology*, vol. 46, pp. 2287-2296, 2011.