

KHẢO SÁT YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG CHIẾT XUẤT ACID CHLOROGENIC VÀ TÁC DỤNG GIẢM TRIGLYCERID MÁU CỦA CAO CHIẾT TỪ HẠT CÀ PHÊ XANH

Lê Trung Khoảng*, Nguyễn Thị Thùy Duyên, Cù Lê Nguyên,
Hà Hoàng Anh Vinh, Chu Thị Thu Hiền, Hoàng Thị Thu Huyền

Khoa Dược, Trường Đại học Buôn Ma Thuột

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu để xác định điều kiện chiết xuất acid chlorogenic từ hạt cà phê xanh, đánh giá độc tính cấp và tác dụng trên lipid máu của cao chiết cà phê xanh thu hái tại tỉnh Đắk Lắk. Khảo sát điều kiện chiết xuất bao gồm: Dung môi (nước, ethanol 50%, ethanol 70% và ethanol 96%), phương pháp chiết (chiết nóng, ngâm lạnh và ngâm kiệt), thời gian chiết (30, 60 và 90 phút), tỷ lệ dung môi/độc liệu (10, 15 và 20). Đánh giá lựa chọn điều kiện chiết dựa vào khối lượng acid chlorogenic thu được trong cao chiết cà phê xanh. Độc tính cấp được tiến hành theo phương pháp của Behrens. Chuột được gây tăng lipid máu bằng phương pháp cho ăn chế độ ăn nhiều chất béo, đánh giá qua các thông số: Nồng độ triglycerid, ldl-cholesterol, và trọng lượng của chuột. Kết quả về lựa chọn điều kiện chiết xuất tối ưu là: Dung môi ethanol 70%, phương pháp chiết nóng, tỷ lệ dung môi/độc liệu là 20/1 và thời gian chiết là 60 phút. Cao chiết thu được có độc tính cấp LD₅₀ là 6,41 ± 0,92 g cao/kg chuột. Về tác dụng trên *in vivo*, cao chiết cà phê xanh liều 150 mg/kg và 300 mg/kg cho tác dụng giảm triglycerid và giảm trọng lượng ở chuột nhắt trắng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ giảm triglycerid và trọng lượng ở 2 nhóm chuột uống cao liều 150 mg/kg và 300 mg/kg. Kết luận, cao chiết cà phê xanh chiết bởi dung môi ethanol 70% có độc tính cấp LD₅₀ là 6,41 ± 0,92 g cao/kg, và cho tác dụng giảm triglycerid ở liều 150 mg/kg và 300 mg/kg trên chuột nhắt trắng được nuôi với chế độ ăn nhiều chất béo.

Từ khóa: Cà phê xanh, chiết xuất, độc tính cấp, giảm cân, giảm triglycerid.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Caffein, một chất được biết đến rất nhiều khi nhắc tới cà phê. Tuy nhiên, trong hạt cà phê xanh (cà phê đã chín nhưng chưa chế biến) còn có một số hoạt chất khác cũng cho tác dụng sinh học, và hiện nay đang được nghiên cứu nhiều trên mô hình động vật và người. Một trong những hoạt chất đó là acid chlorogenic (CGA). CGA là hợp chất có nhiều trong hạt cà phê xanh, sau khi cà phê được chế biến thì hoạt chất phân hủy theo, vì vậy trong cà phê thành phẩm trên thị trường có hàm lượng hoạt chất này rất thấp. Trong khi đó, tác dụng dược lý của CGA được nghiên cứu nhiều trong những năm gần đây: Điều trị tăng huyết áp, tiểu đường, rối loạn lipid huyết, chống oxy hóa, kháng khuẩn, bảo vệ gan. Đặc biệt nghiên cứu lâm sàng trên người trong năm 2018 cho thấy cao chiết cà phê xanh có tác dụng làm giảm huyết áp, glucose máu, giảm cân và chỉ số BMI (Igho *et al.*, 2011; Roshan *et al.*, 2018). Trong khi đó, cà phê, một trong những đặc trưng của nông sản Việt Nam và được trồng nhiều tại các tỉnh khu vực Tây Nguyên. Tuy nhiên, cà phê Việt Nam được sản xuất chủ yếu để xuất khẩu ở dạng thô chưa qua chế biến, và ở trong nước vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về ứng dụng và sản xuất hạt cà phê xanh theo hướng điều trị.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Dược liệu

Hạt cà phê (*Coffea robusta*) được thu hái tại xã Hòa Đông, huyện Krông Pắc, tỉnh Đắk Lắk. Vào tháng 12/2019, loại bỏ tạp, rác và sấy ở 60°C. Tách riêng phần vỏ và nhân, rồi xay nhân cà phê thành bột, đựng trong túi PE và hút chân không để tránh ảnh hưởng của không khí và ẩm.



Hình 1. Cà phê mới thu hái (trái) và sau khi sấy khô - tách vỏ (phải)

Động vật nghiên cứu: Chuột nhắt *Swiss albino*, đực và cái, 6 - 7 tuần tuổi, trọng lượng 20 ± 3 g, khỏe mạnh được cung cấp từ Viện Vaccin và Sinh phẩm y tế Nha Trang, nuôi ổn định trong môi trường thí nghiệm trước 5 - 7 ngày, cung cấp đủ nước, thức ăn đạt tiêu chuẩn của Viện Vaccin và Sinh phẩm y tế Nha Trang trong thử nghiệm.

Hóa chất: Chuẩn Acid chlorogenic 98,3% (Sigma Aldrich - Mỹ), chuẩn Caffein 99,4% (Viện Kiểm nghiệm TP.HCM), acetonitrile (Fisher - Mỹ), acid formic (Fisher - Mỹ), ethanol, methanol, NaCl, nước cất.

Phương pháp nghiên cứu

* Chiết xuất dược liệu

Các thử nghiệm được tiến hành với 30 g bột cà phê xanh, dịch chiết thu được từ các thử nghiệm được cô bởi máy cô quay chân không hoặc trên bếp cách thủy ở 70°C cho tới khi đạt hàm ẩm theo qui định của ĐCVN V. Bảo quản cao thu được trong điều kiện $0 - 8^{\circ}\text{C}$ trong tủ lạnh.

Khảo sát dung môi chiết

Acid chlorogenic dễ tan trong nước và các dung môi phân cực khác. Vì vậy, để an toàn và giảm chi phí, chúng tôi lựa chọn dung môi là cồn 96%, cồn 70%, cồn 50% và nước.

Khảo sát phương pháp chiết

Lựa chọn 3 phương pháp được dung phổ biến hiện nay là: Ngâm lạnh, ngâm kiệt, chiết nóng ở 70°C .

Khảo sát tỷ lệ dung môi/dược liệu

Các mức khảo sát tỷ lệ dung môi/dược liệu lần lượt là: 10, 15 và 20.

Khảo sát thời gian chiết

Tùy theo phương pháp chiết được lựa chọn, sẽ khảo sát thời gian chiết tương ứng.

* Khảo sát một số chỉ tiêu chất lượng của cao chiết thu được

Cảm quan, hàm ẩm, định tính chlorogenic và caffein (HPLC), định lượng chlorogenic và caffein (HPLC), độ tro toàn phần.

Phương pháp định lượng

Hệ thống HPLC: Cột C18 (250×4.6 mm), kích thước hạt 5 μm . Đo tại 2 bước sóng 270 nm (caffein) và 330 nm (CGA). Dung môi: Pha động 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 và tới phút 12,5 là 10% B rồi giữ cố định trong 38,5 phút. Thể tích bơm mẫu là 10 μl . Tốc độ dòng 1 ml/phút.

Thẩm định qui trình

Thẩm định qui trình định lượng CGA với các chỉ tiêu: Tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng.

* Khảo sát độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt

Để cung cấp cơ sở về tính an toàn cho cao chiết từ hạt cà phê xanh tại Đắk Lắk, thử nghiệm về độc tính cấp được tiến hành trên chuột nhắt trắng, sử dụng phương pháp Behren theo hướng dẫn của Bộ Y tế (2015): Chuột được cho nhịn đói qua đêm (ít nhất 12 giờ), thử nghiệm sơ bộ xác định liều lớn nhất không làm chết con nào (LD_0) và liều tối thiểu gây chết 100% chuột (LD_{100}). Sau đó, chia chuột làm nhiều lô (5 chuột /lô) cho uống với liều được chia theo cấp số cộng trong khoảng $\text{LD}_0 - \text{LD}_{100}$. Theo dõi trong 72 giờ, ghi nhận biểu hiện độc (cử động tổng quát, hành vi, trạng thái lông, ăn uống, tiêu tiểu...), số chuột chết sống, lập bảng số liệu, tính LD_{50} :

$$\text{LD}_{50} = D_1 + [(50-a) \times d]/(b-a)$$

Trong đó: D_1 : liều có % chết sát dưới 50%; a: % chết sát dưới 50%; b: % chết sát trên 50%; d: khoảng cách giữa liều có % chết sát dưới 50% và sát trên 50%.

Những chuột sống sau 14 ngày được mổ để xem các cơ quan bên trong có bất thường không.

* Khảo sát tác dụng *in vivo* trên chuột

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 4 lô khác nhau (8 chuột/lô): Lô 1 (sinh lý) cho ăn uống bình thường, lô 2 (chứng bệnh) cho ăn chế độ ăn nhiều chất béo (trong đó mỡ heo chiếm 5%), lô 3 và 4 cho chế độ ăn nhiều chất béo và uống cao cà phê xanh liều 150 mg/kg (Lô cao 1) và 300 mg/kg (Lô cao 2) (Choi *et al.*, 2016). Chuột được theo dõi trọng lượng hàng ngày. Sau 10 tuần, chuột được gây ngạt bằng đá CO_2 và mổ lấy máu tim để đo nồng độ triglycerid, cholesterol tại Trung tâm Xét nghiệm Buôn Ma Thuột (51 Lê Duẩn - Tp. Buôn Ma Thuột - Đắk Lắk).

Phân tích kết quả và xử lý số liệu thống kê

Kết quả xử lý bằng Excel, trình bày dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (Mean $\pm$ SE) và phân tích thống kê với phần mềm SPSS 24.0 bằng phép kiểm Kruskal-Wallis và Mann-Whitney. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ**Chiết xuất dược liệu****Khảo sát dung môi chiết****Bảng 1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết**

Dung môi	Hàm ẩm (%)	Khối lượng cao (g)	Khối lượng CGA thu được (g)
Cồn 96	0,49	3,290	0,747
Cồn 70	3,16	7,620	2,624
Cồn 50	3,56	8,190	2,605
Nước	4,72	6,968	1,581

Theo tính chất được mô tả, thì CGA dễ tan trong dung môi phân cực. Tuy nhiên, kết quả thử nghiệm lựa chọn dung môi cho thấy lượng CGA thu được cao nhất khi sử dụng dung môi cồn 70%. Do CGA cũng là chất thuộc nhóm polyphenol và với nhóm hoạt chất này theo nhiều nghiên cứu thì sử dụng hỗn hợp cồn - nước (50%, 70%) sẽ thu được lượng hoạt chất nhiều hơn so với việc sử dụng riêng cồn hoặc nước. Sử dụng cồn 70% thu được hàm lượng hoạt chất cao hơn (ít tạp hơn) so với cồn 50%, hơn nữa, với dung môi cồn 70% để tiến hành lọc hơn. Do vậy, chúng tôi lựa chọn cồn 70% để tiếp tục khảo sát.

Khảo sát phương pháp chiết**Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của phương pháp chiết**

Phương pháp	Hàm ẩm (%)	Khối lượng cao (g)	Khối lượng CGA thu được (g)
Nóng	6,29	7,144	2,606
Ngâm lạnh	2,68	6,262	2,153
Ngâm kiệt	1,21	8,017	2,425

Kết quả thu được cho thấy phương pháp chiết nóng thu được lượng CGA nhiều hơn. Mặc dù phương pháp ngâm lạnh (48h, có dùng máy khuấy 250 vòng/phút) và ngâm kiệt (16h) đơn giản, an toàn, tuy nhiên hiệu quả thu được không cao. Vì vậy để tiết kiệm thời gian và thu được hiệu quả cao nhất, phương pháp chiết nóng được chọn để tiếp tục nghiên cứu.

Khảo sát tỷ lệ dung môi/dược liệu**Bảng 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/dược liệu**

Tỷ lệ dung môi/ dược liệu	Hàm ẩm (%)	Khối lượng cao (g)	Khối lượng CGA thu được (g)
10	3,31	7,820	2,595
15	7,27	8,420	2,682
20	8,90	8,737	2,807

Với lượng dung môi sử dụng càng nhiều, lượng hoạt chất chiết được tăng, do vậy chúng tôi lựa chọn tỷ lệ dung môi/dược liệu là 20/1 để tiếp tục khảo sát.

Khảo sát thời gian chiết**Bảng 4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết**

Thời gian chiết (phút)	Hàm ẩm (%)	Khối lượng cao (g)	Khối lượng CGA thu được (g)
30	6,35	7,918	2,685
60	8,90	8,738	2,807
90	6,54	8,222	2,749

Thời gian chiết được khảo sát ở 3 mức: 30, 60 và 90 phút, lượng hoạt chất chiết được tăng dần trong thời gian từ 30 đến 60 phút, nhưng lại giảm khi kéo dài 90 phút. Do vậy, chúng tôi lựa chọn thời gian chiết là 60 phút.

Khảo sát một số chỉ tiêu chất lượng của cao chiết thu được

Cảm quan: Cao chiết có màu vàng nâu, mùi thơm đặc trưng, vị đắng chát. Hàm ẩm: 5,2%. Định tính chlorogenic và caffein (HPLC): Thời gian lưu trùng với chất chuẩn tương ứng. Định lượng chlorogenic và caffein (HPLC): 30,48% CGA và 13,95% caffein. Độ tro toàn phần: 2,1%.

Thẩm định quy trình định lượng CGA

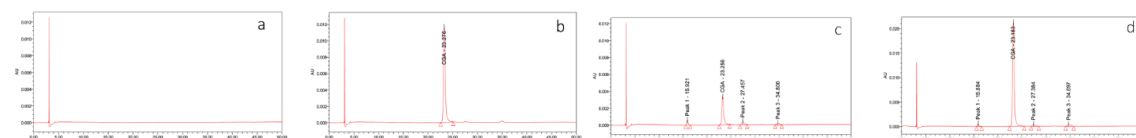
Tính tương thích hệ thống: Để đánh giá tính tương thích hệ thống, chúng tôi tiến hành tiêm mẫu CGA chuẩn 6 lần vào hệ thống với điều kiện sắc ký đã chọn và ghi nhận sắc ký đồ.

Bảng 5. Kết quả đánh giá tính tương thích hệ thống

STT	1	2	3	4	5	6	RDS (%)	Yêu cầu
Thời gian lưu	23,331	23,473	23,311	23,225	23,193	23,213	0,450994	RSD < 2%
Diện tích	308115	307315	308015	306030	296383	303579	1,477195	RSD < 2%

Qua bảng kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống chúng tôi nhận thấy rằng cả thời gian lưu và diện tích pic đều có độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) nhỏ hơn 2%, từ đó chúng tôi có thể kết luận rằng hệ thống HPLC đang sử dụng thích hợp cho việc định lượng CGA.

Độ đặc hiệu: Để đánh giá độ đặc hiệu chúng tôi tiến hành với mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn.



Hình 2. Mẫu trắng (a) và mẫu chuẩn (b), mẫu thử (c), mẫu thử thêm chuẩn (d)

Kết quả cho thấy, mẫu trắng (a) không có peak nào trùng với mẫu chuẩn (b). Thời gian lưu của CGA trong mẫu chuẩn và mẫu thử tương đương nhau, và khi thêm chất chuẩn vào mẫu thử (d) thì peak CGA tăng lên so với mẫu thử (c).

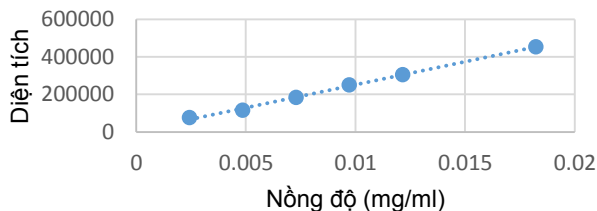
Khoảng tuyến tính: Để đánh giá khoảng tuyến tính, chúng tôi pha dung dịch chuẩn với nồng độ trong khoảng 0,0025 - 0,018 mg/ml và tiến hành chạy sắc ký với điều kiện đã chọn.

Bảng 6. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ (mg/ml)	0,00243	0,00486	0,00729	0,00972	0,01215	0,01823
Diện tích	75044	114170	183048	249532	304470	451943

Dựa vào bảng kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của CGA chúng tôi nhận thấy rằng giữa nồng độ và diện tích pic có mối quan hệ tương quan tuyến tính theo phương trình $Y = 2 \times 10^7 X + 7240,4$ với hệ số $R^2 = 0,9975$.

Độ lặp lại: Để đánh giá độ lặp lại, chúng tôi chạy 6 mẫu thử khác nhau có cùng nồng độ với điều kiện sắc ký đã chọn.



Hình 3. Đường chuẩn của acid chlorogenic trong khoảng nồng độ khảo sát

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ lặp lại

	1	2	3	4	5	6	RSD (%)	Yêu cầu
Thời gian lưu	23,241	23,239	23,207	23,229	23,267	23,235	0,083568	RSD < 2%
Diện tích	99358	99243	100609	100500	100895	97125	1,406315	RSD < 2%

Kết quả cho thấy, phương pháp HPLC dùng để định lượng CGA cho độ lặp lại tốt với RSD < 2%.

Độ đúng: Thực hiện phương pháp thêm chuẩn, cho vào mẫu thử một lượng chất đối chiếu tương ứng ở các nồng độ khác nhau và tiến hành sắc ký với điều kiện đã khảo sát. Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua độ thu hồi.

Bảng 8. Kết quả đánh giá độ đúng

Mẫu	Nồng độ chuẩn đã thêm (mg/L)	Tính được (mg/L)	Độ thu hồi (%)
1	5,361	5,548	103,49
2	7,289	7,282	99,90
3	8,822	8,515	96,52

Dựa vào bảng kết quả trên chúng tôi nhận thấy rằng phương pháp HPLC với điều kiện sắc ký đã khảo sát áp dụng để xác định hàm lượng CGA đạt độ đúng tốt với độ thu hồi 96,52-103,49%.

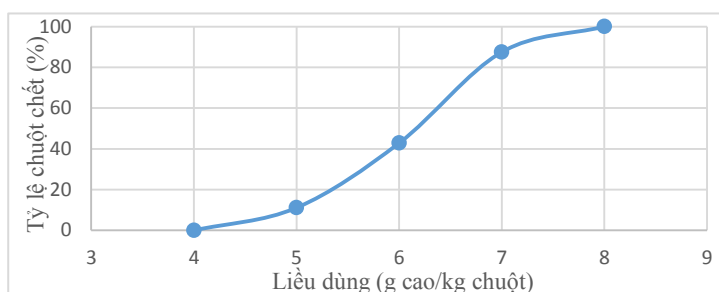
Khảo sát độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt

Bảng 9. Kết quả khảo sát độc tính cấp theo phương pháp Behrens

Liều thử (g/kg)	Số chuột thử nghiệm	Số chuột chết/sống trên thực tế	Số chuột chết/sống tích lũy	Tổng số chuột chết và sống tích lũy	Tỷ lệ chuột chết (%)
4	5	0/5	0/13	13	0
5	5	1/4	1/8	9	11,11
6	5	2/3	3/4	7	42,85
7	5	4/1	7/1	8	87,5
8	5	5/0	12/0	12	100

Độc tính cấp của cao chiết xác định theo phương pháp Behrens $LD_{50} = 6,41 \pm 0,92$ g cao/kg chuột.

Chuột bị chết trong thử nghiệm độc tính cấp trong vòng 72 giờ và chuột sống sau 14 ngày được mổ để quan sát đại thể của các cơ quan. Kết quả cho thấy không có sự thay đổi về đại thể ở các chuột bị chết ở các thời điểm khác nhau trong vòng 72 giờ sau khi cho chuột uống cao thử cũng như ở chuột còn sống sau 14 ngày thử nghiệm.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn tỷ lệ chuột chết tích lũy theo liều cao cà phê xanh

Khảo sát tác dụng *in vivo* trên chuột

Tác dụng trên trọng lượng chuột

Bảng 10. Trọng lượng của chuột đo được trong 10 tuần nuôi

Lô	Ngày 0	Ngày 10	Ngày 20	Ngày 30	Ngày 40	Ngày 50	Ngày 60	Hiệu số ngày đầu – cuối
Cao 1	30,1 ± 0,77	40,88 ± 2,02	44,63 ± 2,87	45,50 ± 2,69	45,88 ± 2,83	47,50 ± 2,44	50,61 ± 1,93	20,31 ± 1,36*
Cao 2	29,87 ± 1,14	40,00 ± 1,34	43,38 ± 1,00	45,88 ± 1,19	47,50 ± 1,21	49,50 ± 1,21	50,37 ± 0,86	20,49 ± 1,64*
Bệnh lý	30,39 ± 1,01	41,75 ± 1,39	47,75 ± 1,49	52,50 ± 2,07	54,38 ± 1,77	57,25 ± 1,82	56,99 ± 1,51	26,57 ± 1,83
Sinh lý	29,60 ± 0,85	41,13 ± 1,46	41,50 ± 1,35	43,50 ± 1,20	45,13 ± 1,19	47,13 ± 1,13	47,41 ± 0,57	17,82 ± 1,17 [#]

* : $p < 0,05$ so với lô bệnh lý; #: $p < 0,005$ so với lô bệnh lý.

Kết quả cho thấy cao chiết từ hạt cà phê xanh có tác dụng làm giảm trọng lượng cơ thể chuột với mô hình cho ăn nhiều chất béo trong 10 tuần và khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với nhóm bệnh lý. Tuy nhiên, lô chuột uống cao vẫn chưa làm giảm trọng lượng về tương đương so với nhóm sinh lý.

Tác dụng trên chỉ số triglycerid và LDL-cholesterol**Bảng 11. Chỉ số triglyceride và ldl-cholesterol của các nhóm chuột thử nghiệm**

	Triglycerid (mmol/L)	LDL-cholesterol (mmol/L)
Cao 1 (n = 8)	1,85 ± 0,05 *	0,95 ± 0,12
Cao 2 (n = 8)	1,73 ± 0,05 #	0,90 ± 0,06
Bệnh lý (n = 8)	2,37 ± 0,13	1,02 ± 0,1
Sinh lý (n = 8)	1,64 ± 0,08 #	0,78 ± 0,04

* : $p < 0,05$ so với lô bệnh lý; #: $p < 0,005$ so với lô bệnh lý

Kết quả cho thấy, cao chiết từ hạt cà phê xanh có tác dụng làm giảm triglycerid máu so với nhóm bệnh lý, mặc dù chỉ số này vẫn cao hơn so với nhóm sinh lý nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Chúng tôi có khảo sát thêm về thông số LDL-cholesterol, tuy nhiên trong mô hình gây béo dù có sự gia tăng LDL-cholesterol nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa nhóm sinh lý và nhóm bệnh lý.

BÀN LUẬN

CGA là hoạt chất thuộc nhóm polyphenol, tuy nhiên có đặc điểm là khá dễ tan trong nước vì vậy có thể lựa chọn hỗn hợp cồn - nước để chiết. Qua khảo sát, kết quả thu được cũng giống một số tác giả khác khi lựa chọn dung môi cồn 50 - 70% để chiết hợp chất polyphenol (Rajbhar *et al.*, 2015). Đối với phương pháp chiết, có thể cân nhắc lựa chọn giữa chiết nóng và ngâm kiệt. Theo kết quả thu được, phương pháp chiết nóng thu được lượng hoạt chất nhiều hơn và ít tạp chất hơn so với phương pháp ngâm kiệt. Tuy nhiên, với dung môi sử dụng là cồn 70% sẽ gặp nhiều khó khăn khi triển khai chiết ở quy mô lớn hơn, trong khi đó chiết ngâm kiệt đơn giản và dễ tiến hành hơn. Với ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi, khi gia tăng thì lượng hoạt chất chiết được tăng nhưng khác biệt không quá nhiều (8%) giữa tỷ lệ 10 và 20, nhưng lượng dung môi tăng gấp đôi (yêu cầu dụng cụ chiết lớn hơn, thời gian cô cao lâu hơn). Có thể do độ tan của CGA trong dung môi cồn 70% rất tốt, do vậy ít có sự khác biệt khi gia tăng lượng dung môi, kết quả này tương tự như tác giả Dibert đề cập trong nghiên cứu trước đó (Dibert *et al.*, 1989). Với thời gian chiết cũng tương tự, có thể do CGA tan tốt nên ít có sự khác biệt khi chiết với thời gian khác nhau. Hơn nữa, do bản chất của CGA là polyphenol nên càng tiếp xúc với nhiệt lâu thì càng dễ bị oxy hoá và làm giảm hiệu suất chiết.

Kết quả thử nghiệm *in vivo*, cao chiết thu được có độc tính $LD_{50} = 6,41 \pm 0,92$ g cao/kg chuột. Trong mô hình cho ăn nhiều chất béo có gây tăng trọng lượng và tăng triglycerid, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm sinh lý và nhóm bệnh. Tuy nhiên, chỉ số LDL-cholesterol của nhóm bệnh lý có tăng so với nhóm sinh lý nhưng không có ý nghĩa thống kê. Và khi sử dụng cao chiết ở 2 mức liều khác nhau, đều có tác dụng làm giảm trọng lượng chuột và TG so với nhóm bệnh lý, mặc dù vẫn chưa đưa được các chỉ số này về tương đương với nhóm sinh lý, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đó về tác dụng trên lipid của cao chiết từ hạt cà phê xanh (Song *et al.*, 2014).

KẾT LUẬN

Đã lựa chọn được điều kiện để chiết acid chlorogenic từ hạt cà phê xanh: Dung môi cồn 70%, phương pháp chiết nóng, thời gian chiết 60 phút và tỷ lệ dung môi/dược liệu là 20/1. Cao chiết thu được đã được khảo sát chỉ tiêu chất lượng và xác định được độc tính cấp $LD_{50} = 6,41 \pm 0,92$ g cao/kg chuột. Thử nghiệm trên chuột cho thấy cao chiết có tác dụng làm giảm cân và triglycerid so với nhóm bệnh lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2015). Thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu. Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT 27/10/2015.
- Choi BK, Park SB, Lee DR, *et al.* (2016). Green coffee bean extract improves obesity by decreasing body fat in high-fat diet-induced obese mice. *Asian Pacific J Trop Med* 9(7): 635-643.
- Dibert K, Cros E, Andrieu J (1989). Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *J Food Engin* 10: 199-214.
- Onakpoya I, Terry R, Ernst E (2011). 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.
- Rajbhar K (2015). Polyphenols: methods of extraction. *Sci Revs Chem Commun* 5(1): 1-6.

Hanieh R, Nikpayam O, Sedaghat M, et. al (2018). 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* 119(3): 250-258.

Song SJ, Choi S, Park T (2014). Decaffeinated green coffee bean extract attenuates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014: 718-379.

STUDYING EXTRACTION CONDITIONS OF ACID CHLOROGENIC AND EFFECT OF REDUCING TRIGLYCERIDE OF GREEN COFFEE BEAN EXTRACT

**Le Trung Khoang^{*}, Nguyen Thi Thuy Duyen, Cu Le Nguyen,
Ha Hoang Anh Vinh, Chu Thi Thu Hien, Hoang Thi Thu Huyen**

Faculty of Pharmacy, Buon Ma Thuot University

SUMMARY

The aim of study is to find the extraction conditions of acid chlorogenic from green coffee beans, evaluate oral acute toxicity and effect on lipidemia of green coffee bean extract (GCBE) from Dak Lak province. The extraction conditions were evaluated including: solvents (water, ethanol 50%, ethanol 70% and ethanol 96%), method extractions (hot extraction, maceration extraction and percolation extraction), extraction time (30, 60 and 90 minutes), ratio solvent/material (10, 15 and 20). The evaluating parameter was amounts of chlorogenic acid in GCBE. Oral acute toxicity of GCBE was carried out by Behrens' method. Mice were induced hyperlipidemia with course of 10 weeks high fat diet, and measured by triglyceride and ldl - cholesterol levels in plasma, and sub-criteria was weight of mice. As the results, the optimal extraction conditions including: ethanol 70% solvent, hot extraction method, 60 minutes extraction time and the ratio of solvent:material = 20:1. The GCBE showed oral acute toxicity in mice with LD₅₀: 6.41 ± 0.92 g/kg. For *in vivo* effect, The GCBE with both doses 150 mg/kg and 300 mg/kg had been shown to reduce weight and triglyceride levels compared to pathological group significantly. There were no statistically significant differences in parameters (weight and triglycerid levels) from two groups received GCBE dose 150 mg/kg and 300 mg/kg. In conclusion, the 70% ethanol extracts from green coffee beans showed oral acute toxicity in mice with LD₅₀: 6.41 ± 0.92 g/kg. In mice with course of 10 weeks high fat diet, both oral administration doses 150 mg/kg and 300 mg/kg had triglyceride lowering effect.

Keywords: Extraction, green coffee beans, lowering triglyceride, oral acute toxicity, weight loss.

^{*} Author for correspondence: Tel: + 84-906866301; Email: Trungkhoang@gmail.com