

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH TÁCH CAFFEIN TỪ LÁ CHÈ XANH BẰNG PHƯƠNG PHÁP HẤP PHỤ CHỌN LỌC

Đến tòa soạn 05/12/2016

Trần Thị Hằng, Vũ Đình Ngọ, Quách Thị Thanh Vân

Nguyễn Đức Duy, Nguyễn Đức Tuân

Khoa Công nghệ Hoá học, Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì

Đàm Thị Thanh Hương

Khoa Công nghệ Môi trường, Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì

SUMMARY

OPTIMIZE PROCESS OF CAFFEINE EXTRACTION FROM FRESH GREEN TEA LEAVES BY SELECTIVE ADSORPTION METHOD

A highly efficient extraction of caffeine from fresh green tea leaves by using water as the extraction solvent, DM310 macroporous as a selective adsorbent and ethyl acetate as a desorption solvent was developed. This desorption solvent is a new bio-renewable agrochemical solvent, naturally produced by fermentation from corn derived feedstock, which has been recently considered as a very suitable and environmental benign solvent for food industrial applications. The optimum conditions to extract caffeine from Phu Tho province's fresh green tea leaves determined: maximum achieved extraction efficiency of caffeine with water using selective adsorbent was obtained at 90 °C for 10 min with fresh green tea leaves/water ratio of 1/5 g/ml. The caffeine extraction efficiency achieved 86.7% with high purity.

Keywords: *caffeine, DM310 macroporous, ethyl acetate, high purity, green solvent*

1. MỞ ĐẦU

Cafein ($C_8H_{10}N_4O_2$), danh pháp quốc tế là 1,3,7-trimethylpurin-2,6-dion, thuộc nhóm các chất metylxantin, là chất kích thích tự nhiên có nhiều trong lá chè, hạt cà phê, hạt coca và các loài thực vật khác [1]. Cafein kích thích hệ thần kinh trung ương, làm cho tinh thần minh mẫn, tăng cường sự nhận biết của não bộ, kích thích

hoạt động tim, thận, phổi [2,3] đã và đang có ứng dụng nhiều trong dược phẩm. Cafein chiếm khoảng 2-4% trong chè theo trọng lượng khô tùy theo điều kiện canh tác, thổ nhưỡng, khí hậu [4]. Hiện nay, có nhiều phương pháp chiết tách cafein từ chè như: phương pháp chiết CO_2 siêu tới hạn [5,6], chiết dưới áp suất cao [7], chiết dưới sự hỗ trợ của lò vi sóng [8]. Tuy nhiên,

phương pháp CO₂ siêu tới hạn có nguy cơ làm mất thành phần catechin quan trọng [9-11]. Hơn nữa, những phương pháp này đòi hỏi kỹ thuật cao, phù hợp với quy mô nhỏ, khó thực hiện với điều kiện công nghiệp. Hiện nay, cafein phần lớn được nhập khẩu, do đó cần xây dựng quy trình công nghệ phù hợp để hướng tới ứng dụng trong công nghiệp, làm chủ công nghệ. Phương pháp tách truyền thống bằng nước nóng có lẽ vẫn là phương pháp hiệu quả hiện nay. Đến nay, trong và ngoài nước có một số công trình công bố phương pháp tách cafein sử dụng phương pháp nước nóng và dung môi chiết như: benzene, clorofom, trichloroetylen [12] hay than hoạt tính để hấp phụ [13]. Tuy nhiên, có bằng chứng đưa ra rằng những dung môi clo hóa có khả năng gây ung thư [14]. Hấp phụ bằng than hoạt tính, nhưng hiệu suất tách cafein chỉ đạt hơn 20%. Ngoài ra, sau khi tách chiết ít công trình xác định cấu trúc cũng như một số tính chất của cafein. Etyl acetat được biết có thể phân hủy sinh học hoàn toàn, không ăn mòn, không gây ung thư, không làm giảm nồng độ ozon, đã được công nhận an toàn bởi độc tính thấp, được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ xác nhận như dược phẩm, phụ gia thực phẩm [15]. Dung môi này còn được gọi là “dung môi xanh” được sử dụng rộng rãi trong tách chiết các hợp chất từ thực vật. Phú Thọ là một trong những vùng sản xuất chè lớn nhất cả nước. Đây là nguồn nguyên liệu dồi dào cung cấp cafein. Bài

báo này công bố quy trình tách cafein từ lá chè xanh Phú Thọ bằng phương pháp hấp phụ chọn lọc sử dụng dung môi xanh và xác định độ tinh khiết của cafein để hướng tới ứng dụng trong các lĩnh vực y dược, thực phẩm chức năng.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Chè xanh gồm tôm và 3 lá của búp chè lẫn một ít cẳng non, thu mua từ cơ sở sản xuất chè Phú Đa, Thanh Sơn, Phú Thọ. DM130 (Trung Quốc), etyl acetat (Sigma-Aldrich), cafein chuẩn, dung dịch Pb(II), Cd(II), Cu(II) chuẩn (Wako, Nhật Bản) sử dụng không qua tinh chế lại.

2.2. Thiết bị

Cấu trúc của cafein được xác định bằng phổ hồng ngoại biến đổi (FT-IR: Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR spectrometer, Mỹ), phổ ¹H NMR (500 MHz) và ¹³C NMR (125 MHz) (AVANCE Spectrometer, Bruker, Đức) với dung môi CDCl₃, chất chuẩn nội TMS. Nhiệt độ nóng chảy của cafein được xác định bằng phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC: EXSTRAR6100, Seiko Instruments, Nhật Bản). Độ tinh khiết của cafein được xác định bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC: Agilent 1100, Đức) cột C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm) detector ĐA, bước sóng 292 nm và sắc ký bản mỏng được tiến hành trên bản mỏng silica gel, soi UV 254nm. Hàm lượng ion kim loại nặng Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ được xác định bằng phương pháp hấp thụ nguyên tử (AAS, ZA 33-Hitachi, Nhật Bản).

2.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu suất tách cafein

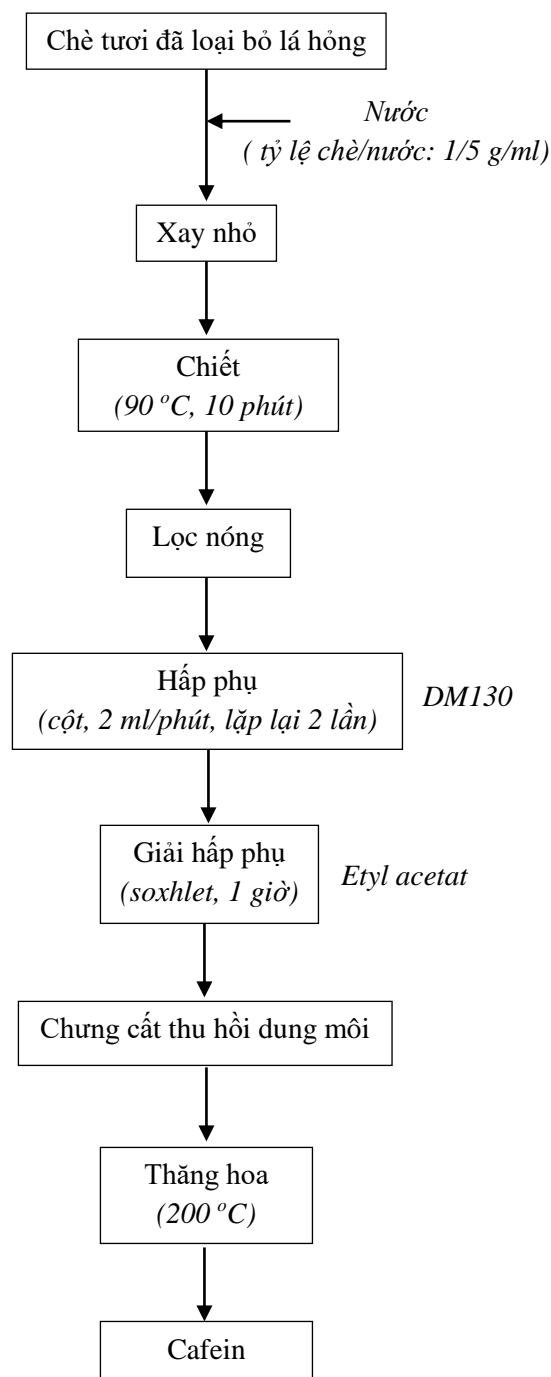
Cân 100 g chè tươi đã loại bỏ lá hồng được xay nhỏ cho vào thiết bị chiết hồi lưu với lượng nước cất nhất định. Sau khi gia nhiệt trong khoảng thời gian nhất định, lọc bã, cho dịch chạy qua cột (đường kính 0,8 cm) nhồi 30 g chất hấp phụ DM310 lưu lượng khoảng 2 ml/phút (lặp lại 2 lần). Dịch lọc được đem đi xử lý tiếp, chất hấp phụ cho vào soxhlet với dung môi etyl acetat trong thời gian 60 phút. Dịch etyl acetat thu được đem đi chưng cất chân không để thu hồi dung môi. Tiếp theo, thăng hoa cặn chiết ở 200 °C. Lượng cafein được đem đi cân, xác định cấu trúc và tính chất. Các điều kiện khảo sát: Tỷ lệ nguyên liệu chè tươi/nước là 1/3, 1/4, 1/5 và 1/6 g/ml; nhiệt độ chiết là 50, 60, 70, 80, 90 và 100 °C, thời gian chiết là 5, 10, 15 và 20 phút.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Quy trình tách chiết cafein từ lá chè xanh

Một số các công trình nghiên cứu tách chiết cafein sử dụng chè đã sấy khô [4-7]. Trong nghiên cứu này, sử dụng nguyên liệu chè tươi nhằm mục đích giảm công đoạn sấy cũng như tiết kiệm năng lượng, hướng tới ứng dụng trong công nghiệp. Ngoài ra, để tiết kiệm dung môi cũng như hiệu suất nhả hấp phụ cao nhất, trong nghiên cứu sử dụng phương pháp soxhlet với etyl acetat -“dung môi xanh” thân thiện môi trường. Tính tan của cafein trong etyl acetat được tác giả Manic cung cộng sự công bố là khoảng

3,2% ở 303 K [16]. Nguyên liệu chè sử dụng trong nghiên cứu có hàm lượng nước là 79,8%, cafein tổng là 3,32 mg/g chất khô. Thông qua khảo sát các yếu tố ảnh



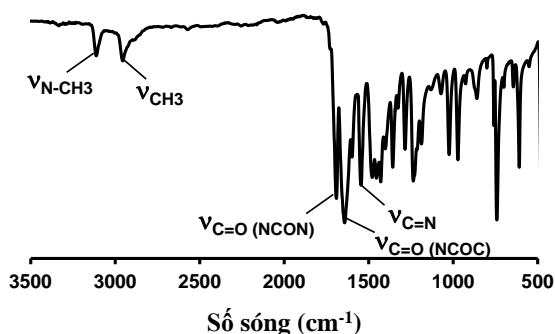
Sơ đồ 1. Quy trình tách chiết cafein từ lá chè xanh bằng phương pháp hấp phụ chọn lọc

hường tới hiệu suất tách chiết cũng như thu hồi cafein từ lá chè xanh Phú Thọ bằng phương pháp nước nóng sử dụng chất hấp phụ chọn lọc cafein (DM130), đã xác định được điều kiện tối ưu, cụ thể: tỷ lệ chè/nước: 1/5 g/ml, nhiệt độ chiết: 90 °C, thời gian chiết: 10 phút. Từ các điều kiện tối ưu này, quy trình tách chiết cafein bằng phương pháp nước nóng sử dụng chất hấp phụ chọn lọc DM310 với dung môi hấp phụ etyl acetat được xây dựng (Sơ đồ 1).

Tách thử nghiệm trên quy trình xây dựng thu được 2,88 mg cafein/1 g chè khô (4,95 g chè tươi). Như vậy, hiệu suất tách chiết đạt tương đối cao (86,7%).

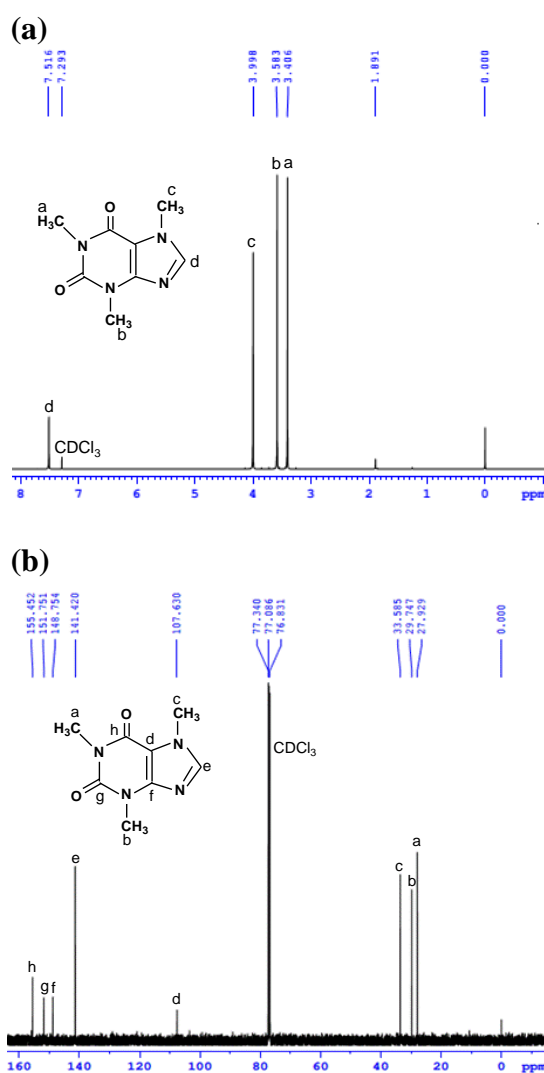
3.2. Đánh giá độ tinh khiết của cafein

Các công trình công bố về tách cafein hầu như chỉ đề cập đến các điều kiện tách chiết mà không kiểm tra cấu trúc cũng như chất lượng cafein thu được. Trong nghiên cứu này, cafein thu được được xác định cấu trúc thông qua phổ FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$. So sánh phổ FT-IR của cafein tách chiết với cafein chuẩn ta thấy, các pic của hai phổ này hoàn



Hình 1. Phổ FT-IR của cafein chiết từ lá chè xanh

toàn trùng nhau. Trên phổ FT-IR xuất hiện các pic hấp thụ ở 2955 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C-H trong nhóm N-CH₃, 3114 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C-H trong nhóm -CH₃, 1656 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C=O trong nhóm cacbonyl liên kết với 2 nguyên tử nitơ, 1634 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C=O trong nhóm cacbonyl liên

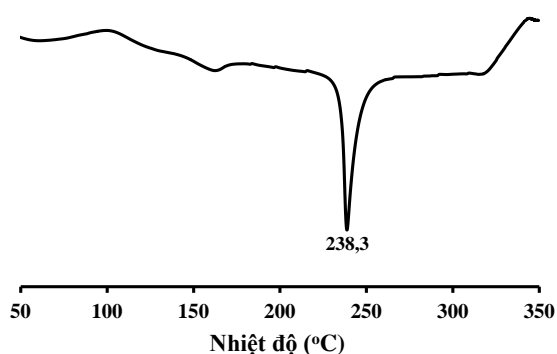


Hình 2. Phổ (a) $^1\text{H-NMR}$ và (b) $^{13}\text{C-NMR}$ của cafein chiết từ lá chè xanh trong dung môi CDCl_3

kết với 1 nguyên tử nitơ và 1543 cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C=N (Hình 1).

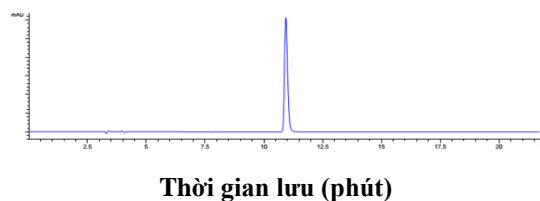
Trong phổ $^1\text{H-NMR}$ (Hình 2a) và $^{13}\text{C-NMR}$ (Hình 2b), ngoài pic đặc trưng của cafein, không quan sát thấy pic nào của tạp chất. Đối với phổ $^1\text{H-NMR}$, các pic 3,41 ppm (s, 3H) đặc trưng cho pic hấp thụ của H_a , 3,58 ppm (s, 3H) đặc trưng cho pic hấp thụ của H_b , 3,99 ppm (s, 3H) đặc trưng cho pic hấp thụ của H_c và 7,52 ppm (s, 1H) đặc trưng cho pic hấp thụ của H_d . Khi phân tích diện tích các pic trong phổ cho tỷ lệ đúng như cấu trúc của cafein. Đối với phổ $^{13}\text{C-NMR}$, thể hiện đầy đủ các pic của cacbon trong cafein, ngoài ra không quan sát thấy pic nào khác.

Cafein tách chiết từ lá chè xanh Phú Thọ được xác định nhiệt độ nóng chảy bằng phương pháp phân tích DSC với tốc độ gia nhiệt $10\text{ }^\circ\text{C/phút}$ (Hình 3). Kết quả cho thấy, trên phổ đồ xuất hiện một pic thu nhiệt ở $238,3\text{ }^\circ\text{C}$. Nhiệt độ nóng chảy của cafein tách chiết được trùng với cafein chuẩn ($238\text{ }^\circ\text{C}$).

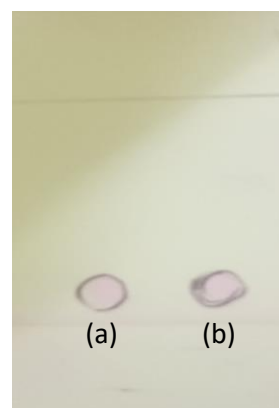


Hình 3. Giảm đồ DSC của cafein chiết từ lá chè xanh dưới tốc độ gia nhiệt $10\text{ }^\circ\text{C/phút}$

Để khẳng định độ tinh khiết của cafein thu được, nghiên cứu còn được đánh giá bằng phương pháp phân tích HPLC. Trên phổ HPLC cũng chỉ quan sát thấy duy nhất một pic xuất hiện ở thời gian lưu là 11 phút, đây chính là pic đặc trưng của cafein (Hình 4). Phổ này cho ta thấy được cafein tách trong nghiên cứu này có độ tinh khiết cao. Theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV, để ứng dụng trong dược phẩm, một trong những tiêu chuẩn cần xác định là độ tinh khiết kiểm nghiệm bằng phương pháp sắc ký bản mỏng. Do đó, sản phẩm cafein tách chiết cùng cafein chuẩn được thực hiện trên sắc ký bản mỏng và quan sát dưới ánh sáng cực tím ở bước sóng 254 nm. Kết quả cho thấy, sản phẩm cafein tách chiết giống



Hình 4. Sắc kí đồ HPLC của cafein chiết từ lá chè xanh



Hình 5. Ảnh sắc ký bản mỏng của (a) cafein chiết từ lá chè xanh và (b) cafein chuẩn

như cafein chuẩn, chỉ quan sát thấy một vùng, không chứa tạp chất, điều này chứng tỏ dưới điều kiện tách chiết nêu trên đã thu được cafein có độ tinh khiết cao (Hình 5). Ngoài ra, kết quả AAS cho thấy, không phát hiện được ion kim loại nặng như Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} chứa trong cafein.

Từ những kết quả trên, có thể khẳng định cafein thu được bằng phương pháp hấp phụ chọn lọc sử dụng DM310 và dung môi giải hấp etyl acetat kết hợp tinh chế bằng phương pháp thăng hoa cho độ tinh khiết cao, có khả năng kỳ vọng trong ứng dụng làm dược phẩm.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình tách chiết cafein từ lá chè xanh sử dụng chất hấp phụ chọn lọc với dung môi giải hấp thân thiện môi trường. Điều kiện tách cafein tối ưu là:

Nhiệt độ tách: 90 °C

Thời gian tách: 10 phút

Tỷ lệ chè tươi/nước: 1/5 g/ml

Quy trình này hiệu suất tách đạt 86,7%.

Đã xác định cấu trúc cũng như độ tinh khiết của cafein tách từ lá chè xanh. Cafein thu được có độ tinh khiết cao, không chứa ion kim loại nặng độc hại.

Quy trình này có thể kỳ vọng ứng dụng được với quy mô lớn, góp phần đa dạng hóa sản phẩm chè, giảm lượng nhập khẩu cafein, đem lại hiệu quả kinh tế cao.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện bởi sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Tỉnh Phú Thọ

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. N. M. Najafia, A. S. Hamidb, R. K. Afshina, "Determination of caffeine in black tea leaves by Fourier transform infrared spectrometry using multiple linear regression", *Microchemical Journal*, 75, 151-158 (2003).
2. G. A. Spiller, "Caffeine Chapter 10: Basic Metabolism and Physiological Effects of the Methylxanthines", *California* (2000).
3. E. Lynge, A. Anttila, K. Hemminki, "Organic solvents and cancer", *Cancer Causes Control*, 8, 406-419 (1997).
4. Bộ môn cây nhiệt đới, "Hóa sinh chè", *NXB Đại học Bách khoa Hà Nội*, (1984).
5. K. Zosel, "Praktische Anwendungen der Stofftrennung mit Überkritischen Gasen", *Chemie*, 90, 748-755 (1978).
6. H. Icen, M. Guru, "Effect of ethanol content on supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes", *The Journal of Supercritical Fluids*, 55, 156-160 (2010).
7. J. Xi, "Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing", *Journal of Food Engineering*, 94, 105-109 (2009).
8. H. Wang, L. Chen, Y. Xu, Q. Zeng, X. Zhang, Q. Zhao, L. Ding, "Dynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with clean-up for determination of caffeine in tea", *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1490-1495 (2011).
9. W. J. Kim, J. D. Kim, J. Kim, S. G., Oh, Y. W. Lee, "Selective caffeine removal

from green tea using supercritical carbondioxide extraction”, *J. Food Eng.*, 89, 303-309 (2008).

10. H. S. Park, H. K. Choi, S. J. Lee, K. W. Park, S. G. Choi, K. H. Kima, “a. Effect of mass transfer on the removal of caffeine from green tea by supercritical carbon dioxide”, *J. Supercrit. Fluids*, 42, 205-212 (2007).

11. H. S. Park, H. J. Lee, M. H. Shin, K. W. Lee, H. Lee, Y. S. Kim, K. O. Kim, K. H. Kim, “b. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide”, *Food Chem.*, 105, 1011-1017 (2007).

12. Nguyễn Minh Thảo, Nguyễn Đình Thành, Hà Thị Điệp, “Tách chiết cophein từ phé liệu chè Việt Nam; tách chiết nicotin từ phé liệu thuốc lá và chuyển hóa nó thành niconamit”, *Đề tài cấp Bộ* (1993-1994).

13. Vo Thi Kim Ngan, “Study on the extraction and isolation of caffeine from green tea *Camellia sinesis* (L.)”, *Master Thesis*, (2010).

14. E. Lynge, A. Anttila, K. Hemminki, “Organic solvents and cancer”, *Cancer Causes Control*, 8, 406-419 (1997).

15. D. V. Bermejoa, P. Lunaa, M. S. Manicb, V. N. Visakb, G. Regleroa, T. Fornaria, “Extraction of caffeine from natural matter using abio-renewable agrochemical solvent”, *Food and bioproducts processing*, 91, 303-309 (2013).

16. M. S. Manic, D. Villanueva, T. Fornari, A. J. Queimada, E. A. Macedo, V. N. Visak, “Solubilities of high-value compounds in ethyl lactate: measurements and modeling”, *J. Chem. Thermodyn*, 48, 93-100 (2012).