

PHÂN TÍCH VÀ ĐÁNH GIÁ HÀM LƯỢNG CAFEIN, THEOBROMIN, THEOPHYLLIN TRONG CÁC LOẠI CHÈ XANH VIỆT NAM CÓ NGUỒN GỐC ĐỊA LÝ KHÁC NHAU

Đến tòa soạn 20/11/2019

Trần Thị Huế, Nguyễn Tân Thành

Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

Ngô Thị Lương, Tạ Thị Thảo, Nguyễn Văn Ri

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

SUMARY

DETERMINATION AND ASSESSMENT OF CAFEIN E, THEOBROMINE, THEOPHYLLINE CONTENT IN VIETNAMESE TEAS COLLECTED IN DIFERENT GEOGRAPHICAL AREAS

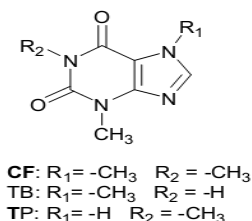
In this study, the content of cafein e (CF), theobromine (TB) and theophylline (TP) were determined in 35 tea samples, including green tea, black tea and different geographical origins (Yen Bai, Tuyen Quang, Thai Nguyen, Ha Giang, Hoa Binh and Lam Dong). High performance liquid chromatography (HPLC) method was used with the optimal separation conditions investigated. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 20 mM, pH = 3 phosphate buffer solution (15:85 v / v) with maximum absorption wavelength at 271 nm at room temperature. Extraction conditions was optimized by factorial design of experiments. Optimum conditions were temperature extraction of 99 ° C, extraction time of 8 minutes. The amounts of TB, TP and CF in tea had been determined by HPLC using the calibration curve. CF, with an average content of 65,8 mg g⁻¹ was the major methylxanthine. TB and TP had average contents of 5,288; 5,859 mg g⁻¹, respectively. The coefficient of variation of the method is less than 1.0%. The recovery for CB, TP and CF ranged from 99.0% to 101.8%. The results of the 35 tea sample colected in different areas showed the weight percentages of the three substances are different. The contents of xanthines in Vietnamese tea reflectthe sources of tea from diferent areas among Northern Midland region, Northern Mountainous region and Tay Nguyen region of Vietnam.

Keywords: cafein e, theobromine, theophylline; original sources; tea; HPLC

1. MỞ ĐẦU

Chè có tên khoa học *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, là một loại thức uống rất phổ biến trên thế giới, ở các nước châu Á đặc biệt là vùng Đông Á. Chè đã là một phần không thể thiếu trong nền văn hóa cũng như ẩm thực. Chè có tác dụng kích thích hệ thần kinh trung ương do họ xanthin có trong chè gồm cafein e (1,3,7-trimethylxanthin) (CF), theobromin (3,7-dimethylxanthin) (TB), và

theophyllin (1,3-dimethylxanthin) (TP). Trong đó, cafein chiếm khoảng 2-5% lượng khô; theobromin và theophyllin với hàm lượng khô nhỏ hơn nhiều so với hàm lượng của cafein, chiếm khoảng 0,33% khối lượng chất khô [1]. Tuy vậy, vai trò của theobromin và theophyllin trong dược tính của cây chè quan trọng hơn so với cafein [2]. Công thức cấu tạo của theobromin, theophyllin và cafein được thể hiện trong hình 1.



Hình 1. Cấu tạo CF, TB và TP

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các yếu tố như giống, chế độ canh tác, điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng, công nghệ chế biến... có ảnh hưởng tới thành phần hóa học của chè, đặc biệt là hàm lượng các chất nhóm xanthin, polyphenol, catechin. Do đó, các loại trà được trồng trong các khu vực địa lý khác nhau sẽ có những khác biệt đáng kể trong thành phần hoá học của chúng [2].

Hiện nay, việc phát triển các phương pháp phân tích để xác định cafein, theobromin, và theophyllin trong các sản phẩm thực phẩm, dịch sinh học và đồ uống có cafein hoặc sô cô la, cũng như trong quá trình sản xuất được phẩm đang rất được quan tâm [3-6]. Một số phương pháp sắc ký đã được đề xuất để xác định những methylxanthin này [8]. Nhiều nghiên cứu về điều kiện chiết chè cũng cho thấy có rất nhiều dung môi, nhiệt độ và thời gian đã được sử dụng để chiết chè trước khi phân tích [5, 8, 10]. Do đó, so sánh dữ liệu từ các nghiên cứu sử dụng các phương pháp chiết xuất khác nhau là không hợp lý. Vì vậy cần phải chuẩn hóa quy trình chiết, phương pháp phân tích và tốt nhất là chiết xuất bằng nước sôi trong 5 phút để mô phỏng việc sử dụng chè hàng ngày, phân tích bằng phương pháp HPLC.

Trong nghiên cứu này, hàm lượng cafein, theobromin và theophyllin trong chè được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (HPLC) với bộ phát hiện DAD, cho phép bơm trực tiếp mẫu vào mà không cần xử lý phức tạp, ngoại trừ một bước lọc. Các methylxanthin này được phân tích trong các loại chè được trồng ở các vùng khác nhau trên Việt Nam (vùng miền núi phía Bắc: Yên Bái, Tuyên Quang, Hà Giang, Hòa Bình; vùng trung du Bắc Bộ: Thái Nguyên và vùng Tây Nguyên: Lâm Đồng). Các thông số

này được coi là bộ mô tả để phân biệt các loại chè theo từng vùng địa lý khác nhau.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

- Các chất chuẩn gồm cafein e, theobromine và theophylline dạng bột của Sigma-Aldrich với độ tinh khiết tương ứng là 99,0% ± 1%, ≥ 98,5%, ≥ 99,0 %.

- Dung dịch đệm photphat 20mM, pH = 3 được chuẩn bị từ K₂HPO₄, H₃PO₄.

- Các hoá chất khác đều thuộc loại tinh khiết như axit axetic, natrihydroxit, axetonitril, methanol (Merck).

- Thiết bị HPLC-DAD-M10A (Shimadzu); Cột chiết pha rắn: C18 500 mg, 6ml; Water Oasis HLB, 6 ml.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Thu thập mẫu: trong nghiên cứu này đã tiến hành phân tích cafein, theophyllin và theobromin trong 35 mẫu chè ở một số tỉnh trung du miền núi phía Bắc Việt Nam và Tây Nguyên (4 mẫu ở Yên Bái, 4 mẫu ở Tuyên Quang, 5 mẫu ở Hà Giang, 4 mẫu ở Hòa Bình, 10 mẫu ở Thái Nguyên và 8 mẫu ở Lâm Đồng). Các mẫu chè xanh, chè đen và chè ôlong được lấy vào túi PE, ghi lý lịch mẫu: ngày, thời gian, địa điểm lấy mẫu và khối lượng mẫu; sau đó được bảo quản trong tủ lạnh (theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 639:1999 (ISO 4072:1982)).

2.3. Quy trình phân tích

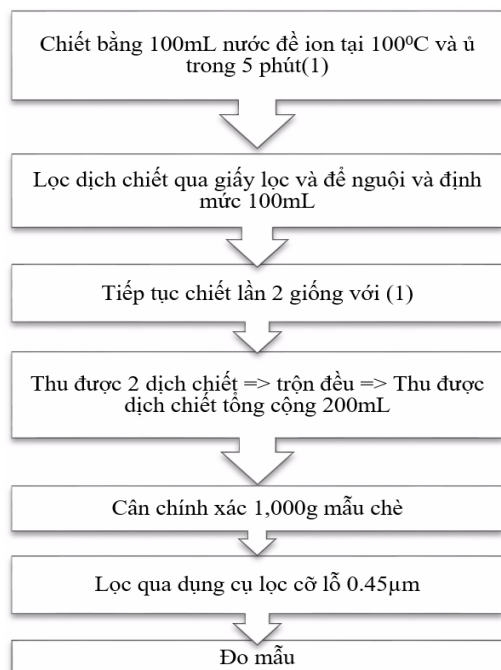
Dung dịch chuẩn gốc (500 ppm mỗi chất) được chuẩn bị bằng cách cân 0,0125g từng chất, hòa tan bằng nước deion (với CF và TP), hoặc bằng dung dịch metanol 50% (với TB) sau đó cho vào bình định mức 25ml, định mức đến vạch và bảo quản ở nhiệt độ từ 0 – 5°C.

Xử lý mẫu chè: Lấy chính xác (± 0,0001g) cỡ 1gam chè khô (đã giữ trong bình hút ẩm) vào cốc thủy tinh có mỏ 100mL. Sau đó thực hiện quy trình chiết thường và chiết theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN) như mô tả ở sơ đồ hình 2 và 3.

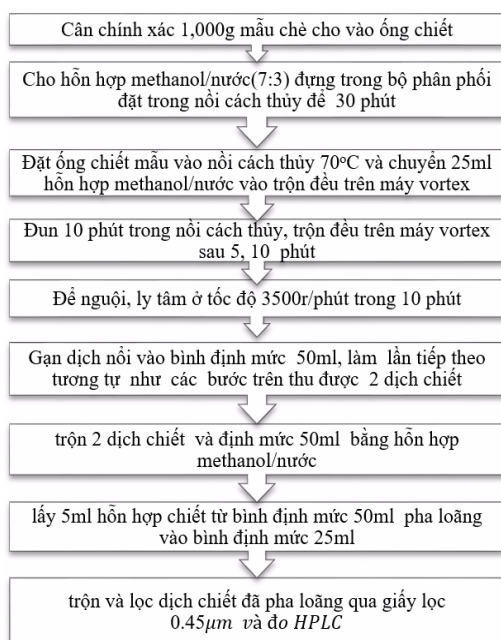
2.4. Phương pháp nghiên cứu

Hàm lượng TB, TP, CF trong các mẫu chè được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), detector DAD, sử dụng cột tách là cột supelcosil RP- C18, pha động bao gồm ACN/ đệm photphat. Những điều kiện và thông số cần thiết cho phép ghi đo HPLC tối ưu, khoảng nồng độ

tuyến tính và đường chuẩn xác định hàm lượng TB, TP và CF đã được nghiên cứu, xác lập và xây dựng. Đánh giá phương pháp đã được tiến hành thông qua tính toán giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại của phép ghi đo và hiệu suất thu hồi trên mẫu chè.



Hình 2. Sơ đồ chiết thường



Hình 3. Sơ đồ chiết theo TCVN

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện phân tích tối ưu trên hệ HPLC

Để tìm được các điều kiện tối ưu cho quá trình tách theobromin, theophyllin và cafein. Chúng tôi đã khảo sát bước sóng tối ưu, thành phần pha động, tốc độ pha động, pH và nồng độ của dung dịch đệm photphat. Kết quả thu được là: cột sử dụng là Supelcosil RP-C18; pha động CAN/ đệm photphat pH 3,0 với nồng độ 20mM; tốc độ dòng là 1,2 ml/phút với chế độ đẳng dòng, thể tích vòng mẫu là 20µL. Thực hiện đo với detector UV tại bước sóng 271nm. Sắc ký đồ tách ba chất trong các loại chè khác nhau thu được ở hình 4.

3.2. Khảo sát quy trình chiết theobromin, theophyllin và cafein trong chè

Thực hiện xử lý mẫu chè xanh tại Hồng Thái-Tân Cương- Thái Nguyên theo quy trình chiết thường và chiết theo TCVN, thu được kết quả ở bảng 2. Sử dụng chuẩn student để so sánh sự sai khác hàm lượng đo được của hai phương pháp chiết chè. Với theobromin: kiểm tra sự sai khác giữa hai phương sai với 5 thí nghiệm lặp lại của mỗi tập số liệu, trị số P là $0,900 > 0,05$. Vậy kết luận hai phương sai khác nhau không có nghĩa. Tiếp đến kiểm tra sự giống hay khác nhau của hai giá trị trung bình sử dụng Minitab 16.0 thu được Pvalue= $0,000 < 0,05$; do vậy hai giá trị trung bình là khác nhau có ý nghĩa thống kê. Với TP, sai khác giữa hai phương sai, P-value= $0,12 > 0,05$, nên hai phương sai khác nhau không có nghĩa; sai khác của hai giá trị trung bình có P-value= $0,000 < 0,05$, nên hai giá trị trung bình của TB là khác nhau có ý nghĩa thống kê. Với CF, hai phương sai khác nhau không có nghĩa (do P-value= $0,35 > 0,05$) còn hai giá trị trung bình của TB là khác nhau có ý nghĩa thống kê (do P-value = $0,000 < 0,05$). Như vậy, hàm lượng TB, TP và CF đo được theo hai phương pháp chiết khác nhau có ý nghĩa thống kê. Chiết thường thu được kết quả có giá trị cao hơn chứng tỏ lượng chất cần được chiết ra là tối ưu hơn và bị mất đi ít hơn trong quá trình chiết. Do đó, quy trình chiết chè theo cách chiết thường được áp dụng. Quy trình này vừa đơn giản hơn, tiết kiệm dung môi và chi phí, thực hiện dễ hơn và hiệu quả hơn.

3.3. Đánh giá phương pháp phân tích

3.3.1. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) trong phương pháp HPLC

Dựa vào phương trình đường chuẩn tính các giá trị LOD và LOQ của ba chất CF, TB, và TP, kết quả được chỉ ra ở bảng 3. Vậy nồng độ thấp nhất của ba xanthin mà hệ thống phân tích còn cho tín hiệu phân tích khác không có nghĩa với tín hiệu của mẫu trắng hay tín hiệu đường nền là $2,83 \pm 0,12$ ppm với TB, đối với TP và CA có giới hạn phát hiện là $1,34 \pm 0,09$ và $0,63 \pm 0,08$ ppm, tương ứng. Nồng độ thấp nhất của ba xanthin CF, TB, và TP mà hệ thống phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao được nghiên cứu trong nghiên cứu này có thể định lượng được lần lượt là $9,43 \pm 0,13$ ppm, $4,46 \pm 0,05$ ppm và $2,12 \pm 0,01$ ppm.

3.3.2. Độ lặp lại của phương pháp phân tích

Để đánh giá độ lặp lại của phương pháp phân tích, tiến hành lặp lại thí nghiệm 6 lần trên

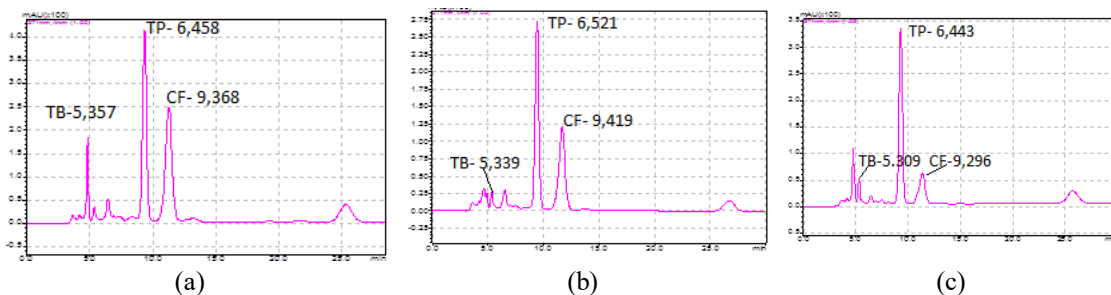
cùng mẫu chè Hồng Thái – Tân Cương – Thái Nguyên. Độ lệch chuẩn và độ lệch chuẩn tương đối RSD% của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với ba chất phân tích có giá trị từ 0,02- 0,86%.

3.3.3. Độ thu hồi

Độ đúng của phương pháp phân tích được xác định bằng cách sử dụng mẫu chè Hồng Thái – Tân Cương – Thái Nguyên, thêm chuẩn tại 3 mức nồng độ 2ppm, 25ppm và 75ppm. Mỗi mức tiến hành làm lặp lại 4 lần. Kết quả phân tích thu được ở bảng 2. Kết quả thực nghiệm cho thấy độ thu hồi của phương pháp phân tích tại điểm thêm chuẩn khác nhau của 3 chất phân tích nằm trong khoảng từ 99 đến 102%. Các giá trị này đều nằm trong khoảng giới hạn cho phép của AOAC. Vì vậy với khoảng nồng độ khảo sát thì phương pháp phân tích có độ chính xác đáp ứng yêu cầu thống kê.

Bảng 1. So sánh kết quả thu được khi chiết theo hai phương pháp khác nhau

Phương pháp chiết	TB (mg/g)	TP (mg/g)	CF (mg/g)
Chiết thường	$124,01 \pm 0,41$	$82,65 \pm 0,69$	$659,08 \pm 0,18$
Chiết theo TCVN	$54,92 \pm 0,02$	$44,61 \pm 0,19$	$312,12 \pm 0,21$



Hình 4. Sắc ký đồ của mẫu (a)- chè xanh, (b)- chè đen và (c)- chè ôlong

3.3.4. Khảo sát khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn xác định đồng thời TB, TP và CF

Từ dung dịch chuẩn gốc pha thành các dung dịch hỗn hợp ba chất có nồng độ 300, 250, 100, 75, 50, 25, 10, 5 ppm của mỗi chất để tiến hành xây dựng đường chuẩn định lượng CF, TB, và TP. Các kết quả thu được sau khi phân tích được xử lý bằng phần mềm MS Excell tìm khoảng tuyến tính và phương trình hồi quy thích hợp. Kết quả cho thấy khoảng tuyến tính của TB là 5ppm- 150ppm, của TP là 5ppm-300ppm và của CF là từ 5ppm- 200ppm và các

phương trình đường chuẩn tương ứng là, TB ($y = 45949x + 109645$, $R^2 = 0.9976$), TP ($y = 67750x + 114029$, $R^2 = 0.9995$), CF ($y = 60929x + 53386$, $R^2 = 0.9966$).

3.4. Phân bố hàm lượng CF, TB, và TP trong mẫu chè

Sắc đồ của ba chất CF, TB, và TP trong mẫu chè xanh, chè đen và chè ôlong trên hệ thống HPLC được chỉ ra ở hình 4. Từ giá trị diện tích pic thu được, dựa vào phương trình đường chuẩn tính được nồng độ của CF, TB, và TP, sau đó tính hàm lượng ba chất trong mẫu chè thể hiện ở bảng 3. Kết quả biểu diễn phân bố

hàm lượng của ba chất được thể hiện trong hình 5. Trong đó, các mẫu chè miền núi phía Bắc có số thứ tự từ 1÷17, các mẫu chè Trung Du Bắc Bộ có số thứ tự từ 18÷27, còn lại là các mẫu Lâm Đồng.

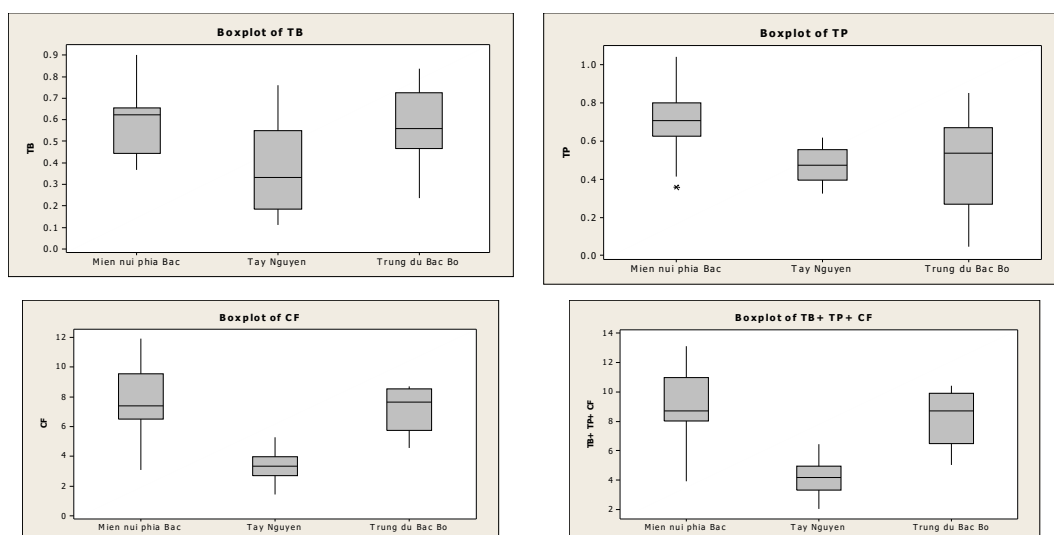
Kết quả hình 5 cho thấy phần trăm khối lượng của tổng ba xanthin trong các mẫu chè miền núi phía Bắc và Trung du Bắc Bộ cao hơn so với vùng Tây Nguyên. Mẫu chè Đại Từ - Thái Nguyên có phần trăm khối lượng của ba xanthin là cao nhất, cụ thể: TB 0,505%; TP 1,038% và CF 11,551%. Và kết quả thấp nhất là đối với mẫu chè Lâm Đồng: TB 0,112%; TP 0,453% và CF 1,457%. Kết quả hình 5 cũng cho thấy, với TB và TP thì phần trăm khối lượng của ba xanthin không có sự chênh lệch nhiều giữa ba vùng địa lý. Tuy nhiên, đối với CF thì có sự khác biệt rõ ràng, cụ thể: vùng miền núi phía Bắc và Trung du Bắc Bộ (6,0-8,0%) cao hơn rất nhiều so với vùng Tây Nguyên (2,5-3,5%). Từ đó dẫn đến tổng hàm lượng ba xanthin tại vùng Tây Nguyên là thấp hơn nhiều so với hai vùng trên.

Kết quả thực nghiệm có thể giải thích: ở vùng Trung du miền núi phía Bắc, cây chè có bề dày lịch sử khoảng 500 năm, chè được trồng trên đất Ferralit đá vôi, với khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa. Trên một miền khí hậu có mùa đông lạnh kéo dài (5-6 tháng /năm) cây chè phát triển tương đối chậm, giúp cho việc tích tụ chất dinh

dưỡng diễn ra chậm, làm cho chè ở vùng này luôn có vị đậm đà. So với cây chè ở trung du miền núi phía Bắc, cây chè Lâm Đồng có lịch sử phát triển muộn hơn rất nhiều (khoảng 150 năm). Cây chè Lâm Đồng được trồng trên đất bazan và khí hậu nhiệt đới núi cao. Mặc dù cũng có nền nhiệt khá thấp (19-23°C) tuy nhiên do nằm ở đới cận nhiệt ẩm nên cây chè phát triển nhanh hơn cây chè phía Bắc. Do vậy hàm lượng ba chất xanthin trong chè Lâm Đồng thường thấp hơn nhiều so với các vùng Trung du miền núi phía Bắc.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp xác định đồng thời theobromin, theophyllin và cafein trong mẫu chè ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam và Lâm Đồng bằng phương pháp HPLC có độ nhạy cao, phương pháp xử lý mẫu đơn giản. Hàm lượng các chất là khác nhau theo vùng địa lý. Tuy nhiên, kết quả trong nghiên cứu còn hạn chế và chưa phân tích được chính xác nguồn gốc của chè, chỉ đánh giá tương đối được ảnh hưởng của vùng địa lý đến hàm lượng các chất trong chè. Đây là những nghiên cứu bước đầu để tạo tiền đề cho các nghiên cứu thành phần TB, TP và CF trong mẫu chè ở các vùng miền khác nhau từ đó xác định được nguồn gốc của chè dựa vào tỷ lệ thành phần hàm lượng của ba chất xanthin trong chè.



Hình 5. Phần trăm khối lượng các xanthin trong các mẫu chè theo khu vực địa lý khác nhau

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Khoa học Kỹ thuật, (2006).
2. Trần Thị Tuyết Thu, Nguyễn Xuân Cự, Nguyễn Phương Hồng, (2012), Ảnh hưởng của mức độ thâm canh khác nhau đến một số tính chất đất và năng suất chè ở Tân Cương, Thái Nguyên, *Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* (22), tr. 56 -61.
2. F. Lo Coco, F. Lanuzza, G. Micali, and G. Cappellano, (2007), Determination of Theobromine, Theophylline and Caffeine in bi-Product of Cupuacu and Cacao Seeds by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 45(5):273-5.
4. Huck.C. W, Guggenbichler.W, Bonn.G. K, (2005), Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry, *Analytical Chimica Acta*, 538, 195-203.
5. L. M. Leticia, L. P. Luis, G. C. Rosalinda, (2003), Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares, *Analytica Chimica Acta*, 493, 83-94
6. Lin, Y. L.; Juan, I. M.; Chen, Y. L.; Liang, Y. C.; Lin, J. K., (1996), Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1387-1394.
7. Horie, H.; Mukai, T.; Kohata, K., (1997), Simultaneous determination of qualitative important components in green tea infusions using capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 758, 332-335.
8. Wang, H.; Helliwell, K.; You, X., (2000), Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC, *Food Chem*, 68, 115-121
9. Marcos, A.; Fisher, A.; Rea, G.; Hill, S., (1998), Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea *J. Anal. At. Spectrom*, 13, 521-525.
10. Fernández-Caceres, P. L.; Martín, M. J.; Pablos, F.; González, A. G., (2001), Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4775-4779.