

ỨNG DỤNG QUANG PHỔ HỒNG NGOẠI (FTIR) KẾT HỢP VỚI PHÂN TÍCH THỐNG KÊ ĐA BIẾN TRONG VIỆC PHÂN LOẠI CÁC SẢN PHẨM HỒ TIÊU VIỆT NAM

Đến tòa soạn 18-02-2021

Nguyễn Quang Trung, Bùi Quang Minh, Lê Việt Anh, Trương Ngọc Minh

Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Trương Ngọc Minh

Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

APPLICATION OF ATR-FTIR AND MULTIVARIATE STATISTICS ANALYSIS (MSA) ON CLASSIFICATION OF PEPPER PRODUCTS IN VIET NAM

*Chemometrics, particularly Multivariate Statistics Analysis techniques including Principle Components Analysis (PCA) and Linear Discriminate Analysis (LDA) were employed to process spectral data, in order to classify Pepper products in Vietnamese commercial market. 14 peppercorns (*Piper nigrum*) samples (black and white), corresponding to 07 different trademarks were collected in supermarkets, local markets and food suppliers within Hanoi and then analyzed directly by ATR-FTIR instrument. Spectral information was simplified by peak selection, before being processed by MSA techniques. In comparison with other conventional spectroscopy methodologies, ATR-FTIR is considered a rapid and convenient method due to its non-wasting time of sample preparation. Results obtained have confirmed the success of trademark identification and classification of pepper products. An obvious separation between trademark groups was presented on LDA observation although there was still certain overlapping occurred on the graph; while with PCA, classification between the two sorts of peppercorn is still an issue that needs further study.*

Key words: Pepper, ATR-FTIR, PCA, LDA.

1. MỞ ĐẦU

Được coi là loại gia vị hàng đầu trong thực phẩm, hồ tiêu (*Piper nigrum*) là cây gia vị quan trọng nhất và được sử dụng nhiều nhất trên thế giới. Có rất nhiều quốc gia vùng nhiệt đới sử dụng hồ tiêu là cây canh tác trọng điểm phục vụ phát triển kinh tế, trong đó, Ấn Độ, Việt Nam và Indonesia là 3 quốc gia sản xuất hồ tiêu chính trên thế giới [1]. Hiện nay trên thị trường, hồ tiêu nguyên hạt được tìm thấy dưới 2 dạng chính: hồ tiêu trắng và hồ tiêu đen. Cùng có nguồn gốc từ cây hồ tiêu, nhưng phụ thuộc vào quy trình chế biến, hồ tiêu đen là các quả còn xanh hoặc vàng (chưa chín), được

phơi nắng ngay sau khi hái khiến vỏ sẫm lại và chuyển thành màu đen; còn hồ tiêu trắng là các quả đã thật chín, được ngâm nước cho mềm và loại bỏ phần vỏ trước khi đem phơi nắng [2]. Ở Việt Nam, hồ tiêu là cây công nghiệp có giá trị kinh tế cao, đem lại nhiều lợi nhuận cho người trồng trọt và được canh tác chủ yếu tại vùng Tây Nguyên. Năm 2017, theo Dương Thị Oanh và Nguyễn Quang Ngọc – Trung tâm nghiên cứu và Phát triển cây hồ tiêu (PRDC), kim ngạch xuất khẩu hồ tiêu năm đạt 1.117 triệu USD, đưa Việt Nam trở thành quốc gia hàng đầu thế giới về sản xuất và xuất khẩu hồ tiêu [3].

Với uy tín về chất lượng của hồ tiêu cũng như giá trị kinh tế mà nó đem lại, đã có không ít cơ sở sản xuất đã lợi dụng những lợi thế trên để làm giả hồ tiêu phục vụ mục đích kinh tế. Tại Việt Nam, tinh bột bắp, bột gạo nếp và một loại tinh bột không rõ nguồn gốc đã được chế biến và pha trộn cùng với hạt tiêu lép nhằm tạo ra sản phẩm hạt tiêu chắt, có trọng lượng nặng hơn và màu sắc đen hơn [4]. Cũng đã có những báo cáo khoa học về việc làm giả hồ tiêu trên thế giới. Dhanya, Syamkumar và Sasikumar đã chỉ ra rằng nhờ vào sự giống nhau về hình dạng và kích thước, giá thành rẻ và nguồn nguyên liệu dồi dào, hạt đu đủ (*Carica papaya* L.) là sản phẩm được sử dụng làm hồ tiêu đen giả nhiều nhất [5]. Thêm vào đó, hạt kê (*Pennisetum glaucum*) và lúa mạch đen (*Fagopyrum esculentum*) cũng đã được tìm thấy dưới dạng thực phẩm dùng để pha trộn vào hồ tiêu [6]. Chính vì vậy, hồ tiêu được đánh giá là một trong những loại thực phẩm rất dễ pha trộn và làm giả trong quá trình chế biến và rất khó có thể nhận biết bằng mắt thường [1].

Dưới thực trạng về hồ tiêu giả nói riêng cũng như vấn đề an toàn thực phẩm nói chung, đặt ra những nguy cơ ảnh hưởng tiêu cực tới sức khỏe người tiêu dùng, việc phát triển các phương pháp để đánh giá chất lượng cũng như phân loại chính xác hồ tiêu là một điều rất cần thiết. Các tổ chức quốc tế uy tín như Tổ chức tiêu chuẩn hóa quốc tế (ISO), Hiệp hội Thương mại gia vị Mỹ (ASTA) hay Hiệp hội các nhà Hóa học phân tích chính thống (AOAC) đã công bố những nghiên cứu, ứng dụng quang phổ trong việc xác định Piperine – một hợp chất tạo nên vị cay chính trong hồ tiêu xanh – sử dụng UV-Vis đo độ hấp thụ quang của Piperine cao nhất tại 343 nm [7]. Tuy nhiên, các phương pháp kể trên đều cần phải sử dụng dung môi phân tích và thường tốn thời gian. Bên cạnh đó, cũng đã có nhiều phương pháp được đưa ra nhằm phân loại các mẫu hạt tiêu đen xay, nhưng các phương pháp này tốn nhiều chi phí cũng như thời gian (Aurich, 2009) [8]. Mặt khác, phương pháp quang phổ hồng ngoại Fourier (FTIR) là một kỹ thuật đã được ứng dụng nhiều và thành công để phân loại và xác thực mẫu cà phê nguyên bản [9-11]. Lợi thế lớn của phương pháp đo phổ kết hợp với hóa

tin (chemometrics) này nằm ở điểm một khi cơ sở dữ liệu được thiết lập và một phương thức phân tích dữ liệu phù hợp được xác định, mẫu phân tích sẽ được quét chỉ trong vài phút.

Do vậy, mục tiêu nghiên cứu trong bài báo này của chúng tôi tập trung vào việc ứng dụng và sử dụng FTIR nhằm xác định và phân loại hồ tiêu Việt Nam, khi thực trạng hồ tiêu kém chất lượng có nguy cơ được phân phối rộng trên thị trường. Qua đó, kết quả phân tích sẽ được dùng để nhận dạng và phân biệt hồ tiêu chính thống, có thương hiệu và cung cấp cơ sở dữ liệu cho việc thẩm định chất lượng hồ tiêu của Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thu thập và xử lý mẫu

14 mẫu hạt tiêu (cả trắng và đen), bao gồm ác thương hiệu khác nhau, được thu thập tại các chợ địa phương và các siêu thị trong phạm vi quận Cầu Giấy và quận Ba Đình, thành phố Hà Nội. Các mẫu được chia thành 07 thương hiệu khác nhau. Trong đó, các sản phẩm được mua tại siêu thị được đóng gói và có thương hiệu rõ ràng, các sản phẩm còn lại, tên địa điểm bán hàng được coi là một thương hiệu riêng biệt. Thông tin 14 mẫu hạt tiêu được trình bày cụ thể tại bảng 1.

Bảng 1. Thông tin thương hiệu và ký hiệu của 14 mẫu hạt tiêu

Thương hiệu	Các loại sản phẩm	
	Trắng	Đen
Vipep	T1	D1
Choice L	T2	D2
Vinmart GOOD	T3	D3
Chợ 800A	T4	D4
Chợ Nghĩa Tân Q1	T5	D5
	T6	-
Chợ Nghĩa Tân Q3	T7	D7
Chợ Linh Lang	-	D8

Các mẫu tiêu dạng hạt được nghiền nhỏ và đồng hóa bằng máy xay mẫu thực phẩm khô (Sunhouse) trước khi được sấy khô tại nhiệt độ 45°C trong vòng 2h đồng hồ trong tủ sấy (Memmert UN110). Sau đó mẫu được đo trực tiếp trên thiết bị quang phổ.

2.2. Phân tích quang phổ hồng ngoại

Sau công đoạn xay nhỏ và sấy khô, các mẫu hạt tiêu bột được phân tích trực tiếp trên thiết bị ATR-FTIR (Nicolet™ iS50, Thermo Scientific,

Mỹ). Khoảng 2 mg tiêu bột được đặt trên bề mặt tinh thể kim cương-ZnSe. Để tăng diện tích tiếp xúc giữa mẫu và cảm biến cũng như đảm bảo thiết bị cho tín hiệu dải phổ tốt nhất, công cụ nén mẫu tích hợp trên thiết bị được sử dụng để áp dụng một lực nhất định lên trên nền mẫu khô. Tín hiệu phổ thu được trên phần mềm OMNIC được cài trong máy tính, có dải bước sóng nằm trong khoảng từ 4000-400 cm^{-1} , bao gồm 70 lần quét mẫu và có độ phân giải 4 cm^{-1} . Mẫu được phân tích lặp lại 5 lần nhằm xác định độ lặp lại và độ tin cậy.

2.3. Kỹ thuật thống kê đa biến

Dữ liệu phổ thu được được hiệu chỉnh đường cơ sở (baseline) và chuyển hóa thành dạng dữ liệu số trên Excel qua công cụ The Unscrambler® X 10.4. Các thông tin chính trên dải phổ được sàng lọc và rút gọn dựa trên các đỉnh peak khác nhau, tạo nên một tập dữ liệu mới.

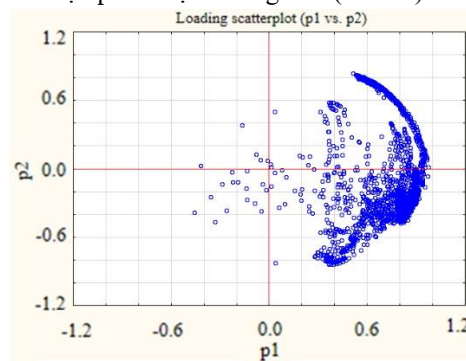
Dựa trên nền tảng thống kê XLSTAT 2016.02.28451, các phép phân tích như PCA – Phân tích thành phần chính và LDA – Phân tích phân biệt được tiến hành trên tập dữ liệu mới: (1) PCA là một công cụ toán học được phát triển nhằm trích xuất các đặc điểm chính từ tập dữ liệu đa chiều và chuyển hóa chúng thành một tập dữ liệu mới ít chiều hơn, được sắp xếp theo thứ tự giảm độ biến thiên hay phương sai. Qua đó, từ một tập dữ liệu gốc đa chiều ban đầu, thông qua sự kết hợp tuyến tính, tập dữ liệu mới được tạo ra, có kích thước nhỏ gọn hơn mà vẫn đảm bảo được những thông tin chính và cần thiết [12]. (2) Trong khi PCA là công cụ trích xuất, chuyển đổi và nén dữ liệu, LDA có thể trích xuất những thông tin khác biệt của dữ liệu và kết hợp tuyến tính các thông tin đó, cung cấp giá trị trung bình khác biệt lớn nhất trong tập dữ liệu. Trong nghiên cứu này, 2 phương pháp nêu trên sẽ được khảo sát và so sánh để tìm ra phương pháp tối ưu cho việc phân loại các mẫu hồ tiêu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát phân tán PCA của 14 mẫu hồ tiêu

Kỹ thuật phân tích thành phần chính (PCA) được thực hiện để xem xét tác động của nguồn gốc và tính phân biệt của 14 mẫu hạt tiêu. Các biến trong tập số liệu gốc thông thường sẽ tương quan với nhau, ở mức độ lớn hoặc thấp

hơn; PCA loại bỏ sự dư thừa này bằng cách chuyển đổi tuyến tính các số liệu gốc thành một tập mới, các biến không tương quan và được gọi là các điểm thành phần chính (PC). Do vậy, các số liệu sẽ được sắp xếp lại, và các điểm thành phần chính đầu tiên được đại diện để mô tả phần lớn các thông tin có trong rất nhiều các biến gốc. Số điểm PC có nghĩa luôn luôn ít hơn số lượng biểu thị, và phương pháp đa biến có thể được thực hiện [10]. Khảo sát phân tán trên mô hình PCA chỉ ra rằng phần lớn bước sóng đóng góp vào sự phân tách các mẫu cà phê trên cả 2 PC. Tuy nhiên cần tiến hành lược bỏ 1 vài bước sóng để các mẫu hồ tiêu được phân biệt rõ ràng hơn (Hình 1).

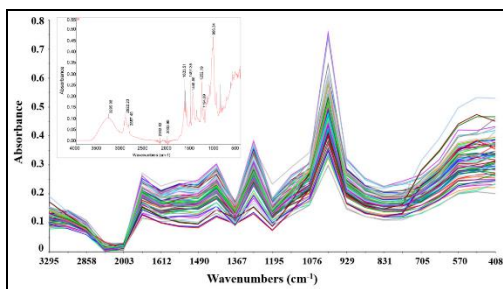


Hình 1. Khảo sát phân tán PCA của 14 mẫu hồ tiêu

3.2. Phân tích phổ hồng ngoại

Dữ liệu phổ của 14 mẫu hạt tiêu được diễn giải trên phổ đồ (Hình 1), bao gồm một phổ đồ đại diện biểu diễn cho các mẫu hạt tiêu và một phổ đồ tổng hợp các đỉnh peak (đã hiệu chỉnh đường cơ sở) của tất cả các mẫu hạt tiêu (bao gồm cả 5 lần đo lặp lại). Đặc điểm chính biểu diễn trên “vùng vân tay” - finger-print của dải phổ là do sự dao động của nhóm $=\text{CO}-\text{C}$ tại điểm 1194 cm^{-1} và 1252 cm^{-1} cũng như CH_2 tại điểm 996 cm^{-1} có trong Oleoresin – loại tinh dầu tạo nên vị cay trong hạt tiêu cũng như các loại gia vị có tính cay khác [13]. Sự dao động này tương ứng với các tín hiệu đặc trưng trên dải phổ tại các vị trí 1633 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} , 1252 cm^{-1} và 996 cm^{-1} .

Có thể thấy rằng nếu chỉ dựa vào thông tin dải phổ qua phân tích FTIR, rất khó có thể nhận biết sự khác nhau giữa các loại hạt tiêu, cho dù sự khác nhau này có tồn tại. Do vậy, sự kết hợp giữa dữ liệu phổ thô với các phép phân tích hóa tin (chemometrics) để tiến hành xác định và phân loại hồ tiêu là hoàn toàn có cơ sở [14].

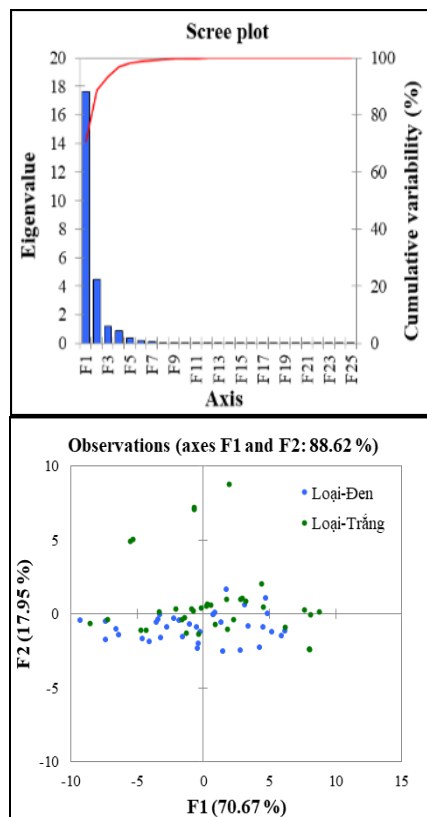


Hình 2. Định peak và tổng hợp dải phổ của 14 mẫu hạt tiêu

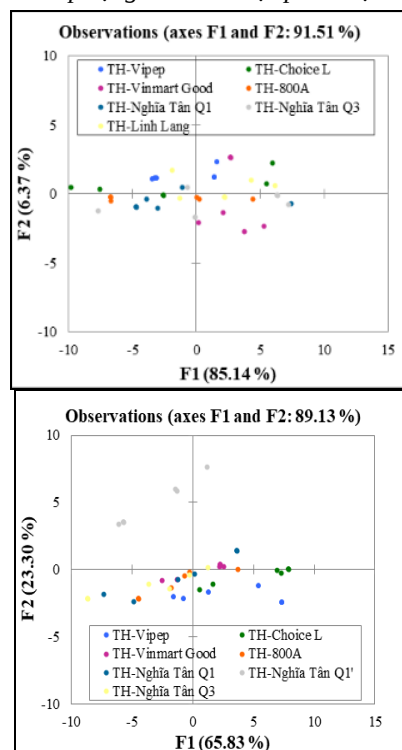
3.3. Ứng dụng phân tích thành phần chính

Hình 3 miêu tả sơ đồ sàng lọc, minh họa số biến các thành phần chính (PCs/F) nắm giữ và sơ đồ PCA, miêu tả sự phân nhóm trên hai loại hồ tiêu đen và trắng. Có thể thấy rằng, hai thành phần chính đầu tiên (F1 và F2) nắm giữ phần lớn các thông tin dữ liệu mẫu, chiếm 88,62% lượng thông tin chính; do đó, có thể nói rằng, kết quả phân loại hồ tiêu trên đồ thị PCA là đáng tin cậy. Kết quả nhận dạng hồ tiêu dựa trên chủng loại chỉ ra rằng khó có thể nhận biết hoàn toàn hai loại trắng và đen qua phương pháp PCA. Tuy nhiên, sự tách nhóm giữa hai loại phần nào đó có thể nhận biết được dựa trên sự phân bố của các mẫu hạt tiêu trên biểu đồ PCA. Sự tương đồng về thành phần có trong hai loại hạt tiêu này được cho là nguyên nhân giải thích hiện tượng trên.

Ngoài việc xác định và nhận biết các chủng loại hồ tiêu, PCA còn được dùng để phân biệt các thương hiệu trên từng loại hồ tiêu. Cho dù hai PC đầu tiên của cả hai biểu đồ (Hình 4a và 4b) đều diễn giải phần lớn các thông tin mẫu, lần lượt là 91.51% và 89.13%, sự phân nhóm thương hiệu trên cả hai loại hồ tiêu trắng và đen là không rõ ràng. Sự phân bố của các điểm tương ứng với từng loại thương hiệu khá rải rác và không tập trung. Duy chỉ có nhóm tiêu trắng có thương hiệu *Nghĩa Tân Q1* ' nằm tách biệt với các nhóm thương hiệu còn lại (Hình 4b). Điều này chứng tỏ rằng thành phần hóa học của loại hạt tiêu có thương hiệu nêu trên có sự khác biệt so với thương hiệu cùng chủng loại khác.



Hình 3. Áp dụng PCA cho việc phân loại hồ tiêu

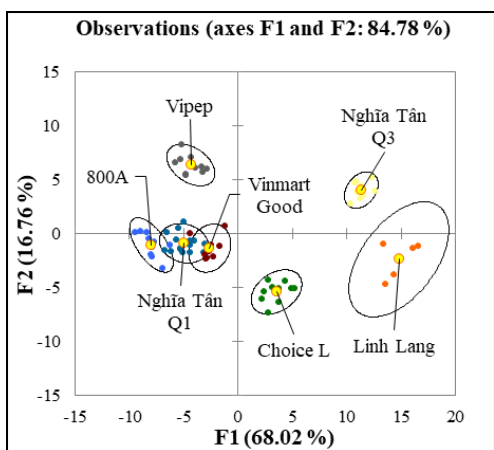


Hình 4. Áp dụng PCA trong nhận dạng thương hiệu hồ tiêu: (a)-Hồ tiêu đen; (b)-Hồ tiêu trắng

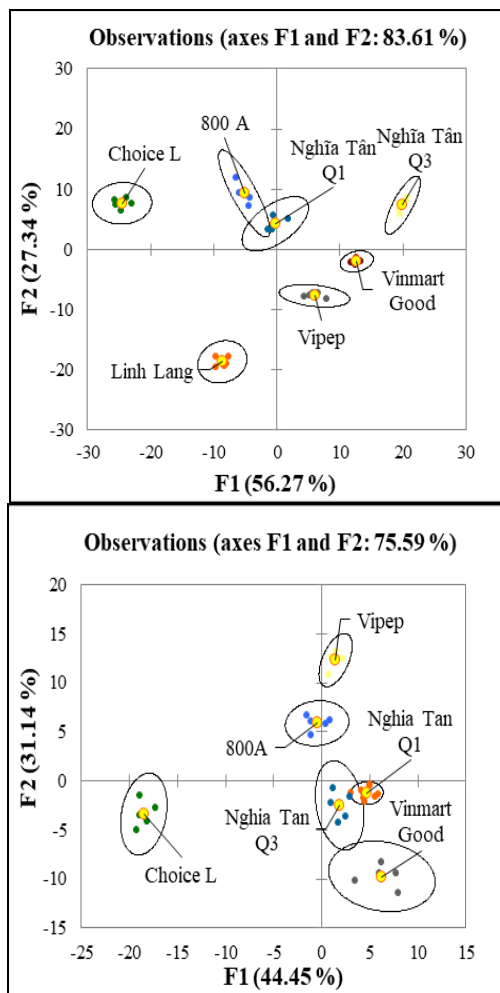
Các kết quả thu được cho thấy hiệu quả của PCA chưa được rõ ràng. Chứng minh cho điều này là sự phân bố rải rác và sự trùng lặp của các thông tin được biểu thị trên biểu đồ PCA.

3.4. Ứng dụng phân tích phân biệt

Với phép phân tích LDA, biểu đồ phân biệt cho kết quả rõ ràng hơn so với PCA. Chúng tôi tiến hành phân biệt thương hiệu trên cả hai chủng loại mẫu (Hình 5) và trên từng chủng loại mẫu (Hình 6) để có được sự đánh giá tổng quan và chính xác nhất. Qua đó, có thể quan sát thấy sự phân nhóm thương hiệu được biểu thị khá rõ trên biểu đồ LDA. Hạt tiêu được thu mua của các thương hiệu 800A, Nghĩa Tân Q1 và Vinmart Good có sự tương đồng nhất định về thành phần hóa học (Hình 5). Đối với hạt tiêu đen (Hình 6a), có xảy ra sự trùng lặp giữa khoảng tin cậy của thương hiệu 800A và thương hiệu Nghĩa Tân Q1. Điều này cũng được biểu thị trên biểu đồ LDA đối với mẫu hạt tiêu trắng (Hình 6b) của ba thương hiệu Nghĩa Tân Q1, Nghĩa Tân Q3 và Vinmart Good.



Hình 5. Nhận diện thương hiệu trên cả 2 chủng loại hồ tiêu, sử dụng mô hình LDA



Hình 6. Nhận diện thương hiệu trên hồ tiêu đen (a) và hồ tiêu trắng (b)

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy việc áp dụng Quang phổ hồng ngoại (ATR-FTIR) kết hợp với kỹ thuật thống kê đa biến bao gồm Phân tích thành phần chính (PCA) và Phân tích phân biệt (LDA) nhằm phân loại và nhận biết các sản phẩm hồ tiêu là khả thi. Qua việc khảo sát và đánh giá 2 phương pháp thống kê đa biến khác nhau, có thể khẳng định rằng LDA là phương pháp hiệu quả hơn khi được dùng để nhận biết thương hiệu của các sản phẩm hồ tiêu. Kết quả nhận dạng thương hiệu được thể hiện rõ ràng hơn trên biểu đồ LDA, trong khi đối với PCA, sự phân nhóm không rõ ràng chỉ ra rằng cần phải có những kỹ thuật tốt hơn mới có thể phân biệt rõ được sự khác nhau giữa 2 chủng loại hồ tiêu. Nhìn chung, mục tiêu đề ra

đã được hoàn thành; tuy nhiên, vẫn cần phải có những nghiên cứu xa hơn để làm rõ cũng như tối ưu hóa hơn nữa phương pháp thực nghiệm.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này được hỗ trợ thực hiện bởi các nhiệm vụ khoa học công nghệ có mã số: TĐNDTP.01/19-21 và QTCZ01.01/20-2

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. S. Wilde, S. A. Haughey, P. G. King & C. T. Elliott. The feasibility of applying NIR and FT-IR fingerprinting to detect adulteration in black pepper. *Food Control*, **2019**, *100*, 1-7.
2. Hạt tiêu cô tẩm. Điểm khác biệt giữa hạt tiêu đen và hạt tiêu trắng là gì, **2016**.
3. D.T. Oanh, N.Q. Ngoc. Đôi nét về thực trạng sản xuất hồ tiêu tại Tây Nguyên hiện nay, **2019**. <http://wasi.org.vn/doi-net-ve-thuc-trang-san-xuat-ho-tieu-tai-tay-nguyen-hien-nay>
4. Công An. Kinh hoàng 'công nghệ' biến hạt tiêu lép thành chắc hạt bằng tạp chất, **2017**. http://congan.com.vn/vu-an/kinh-hoang-cong-nghe-bien-hat-tieu-lep-thanh-chac-hat-bang-tap-chat_34958.html
5. K. Dhanya, S. Syamkumar and B. Sasikumar. Development and application of SCAR marker for the detection of papaya seed adulteration in traded black pepper powder. *Food Biotechnology*, **2009** *23*(2), 97–106.
6. C. M. McGoverin, D. J. F. September, P. Geladia and M. Manley. Near infrared and mid-infrared spectroscopy for the quantification of adulterants in ground black pepper. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **2012**, *20*(5), 521–528.
7. H. Schulz, M. Baranska, R. Quilitzsch, W. Schütze and G. Lösing. Characterization of peppercorn, pepper oil, and pepper oleoresin by vibrational spectroscopy methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2005**, *53*(9), 3358–3363.
8. S. Aurich. NIR-spektrometrische Methoden-Entwicklung zur Qualitätsbewertung von Gewürzen und Kräutern, **2009**. <http://hss.ulb.unibonn.de/2010/2123/2123.pdf>
9. J. Wang, S. Jun, H. C. Bittenbender, L. Gautz and Q. X. Li. Fourier transform infrared spectroscopy for Kona coffee authentication. *Journal of food science*, **2009**, *74*(5), C385–C391.
10. Discrimination between Coffea arabica and Coffea canephora variant robusta beans using infrared spectroscopy, *Food Chemistry*, **1995**, *54*(3), 321-326.
11. D. J. Lyman, R. Benck, S. Dell, S. Merle and M. W. Jacqueline. FTIR-ATR Analysis of Brewed Coffee: Effect of Roasting Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, *51*(11), 3268-3272
12. X. Wu, B. Wu, J. Sun, M. Li and H. Du. Discrimination of Apples Using Near Infrared Spectroscopy and Sorting Discriminant Analysis, *International Journal of Food Properties*, **2016**, *19*(5), 1016-1028.
13. H. Schulz, M. Baranska, R. Quilitzsch, W. Schütze and G. Lösing. Characterization of peppercorn, pepper oil, and pepper oleoresin by vibrational spectroscopy methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, *53*(9), 3358–3363.
14. B. Stuart. *Infrared Spectroscopy*. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, **2005**.