

**ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CAFFEIN, THEOBROMIN VÀ THEOPHYLLIN
TRONG CHÈ BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ (UV/VIS)
KẾT HỢP VỚI HỒI QUI ĐA BIẾN**

Đến tòa soạn 20-11-2018

Trần Thị Huế

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

Trần Thị Thùy Dung, Nguyễn Văn Ri, Tạ Thị Thảo

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

SUMMARY

**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CAFFEINE, THEOBROMINE,
THEOPHYLLINE IN TEA USING ULTRAVIOLET - VISIBLE SPECTROSCOPY
COMBINED WITH MULTIVARIATE ANALYSIS**

An analytical procedure based on the use of ultraviolet – visible spectroscopy combined with multivariate regression was applied for simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in 53 Vietnamese tea samples. The 240-310nm spectral window was used for data acquisition. The partial least squares (PLS) and Artificial Neural Network (ANN) method were used to calculate concentration of 3 analytes in samples. The same model of PLS and ANN with standard matrix of 44 tea samples (the contents of 3 analytes were determined by high performance liquid chromatography) were applied for individual and/or simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in samples. A matrix of test samples including 9 tea samples was used to assess the accuracy of the models. Compared with PLS, the ANN model was better with lower relative error. This work demonstrated that ultraviolet – visible spectrophotometry with ANN model could be simply used to analyse xanthine's contents in tea with simple sample preparation.

Keywords: *caffeine, theobromine, theophylline, multivariable calibration, tea, ultraviolet – visible spectrophotometry*

1. MỞ ĐẦU

Chè là một sản phẩm tự nhiên có nhiều tác dụng tốt đối với sức khỏe con người, được sử dụng rộng rãi không chỉ trong ngành công nghiệp thực phẩm mà còn trong y học do có tác dụng kỳ diệu trong việc phòng chống những bệnh nguy hiểm như chống ung thư, giảm nguy cơ các bệnh tim mạch và các bệnh thoái hóa thần kinh [1]. Chất lượng của sản phẩm chè (chè xanh, chè đen, chè bán lên men...) ngoài phụ thuộc vào công nghệ chế biến còn chịu ảnh hưởng rất lớn bởi chất lượng nguyên liệu sử dụng, trong đó thành phần

hóa học, đặc biệt hàm lượng polyphenol, cafein (CF), theobromin (TB), theophyllin (TP), chất hòa tan sẽ quyết định chất lượng của nó [2].

Để phân tích đồng thời hàm lượng các chất nhóm xanthin gồm cafein, theobromin, theophyllin trong chè chủ yếu phải dùng các kỹ thuật tách, sau đó định lượng như phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [3,4], sắc ký khí (GC)[5]... Tuy nhiên, nhược điểm lớn nhất của các phương pháp này là thời gian phân tích lâu, chi phí dung môi lớn và đòi hỏi phải tiến hành trên thiết bị đắt tiền. UV-Vis từ lâu đã là một

phương pháp phổ biến được dùng để xác định cả các hợp chất hữu cơ và vô cơ. So với các phương pháp phân tích hóa học, thì định lượng trong thực phẩm bằng phổ UV-Vis có ưu điểm nổi trội, không phải xử lý mẫu, phân tích nhanh, giá thành rẻ. Tuy nhiên, không thể áp dụng phương pháp này theo cách thông thường để phân tích đồng thời hàm lượng cafein, theobromin, theophyllin do sự tương đồng về phổ hấp thụ của ba chất trong chè. Vào cuối thế kỷ 20, sự phát triển của phân tích thống kê đa biến dựa trên tập số liệu nhiều chiều cho phép phân tích đồng thời các chất dựa trên dữ liệu phổ UV-Vis, hồng ngoại gần (NIR), Raman, NMR... [6, 7, 8].

Trong nghiên cứu này, cafein, theobromin, theophyllin trong chè được xác định đồng thời bằng phương pháp UV-Vis kết hợp hồi qui đa biến tuyến tính và phi tuyến tính. Với một mô hình đường chuẩn đa biến được xây dựng từ bộ mẫu chuẩn có hàm lượng các chất được xác định bằng phương pháp HPLC, bằng thuật toán hồi quy tuyến tính và phi tuyến tính đã định lượng nhanh và đồng thời được 3 chất thuộc nhóm xanthin trong chè mà không cần tách ra khỏi nhau trước khi phân tích.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

- Các chất chuẩn gồm CF, TB, và TP dạng bột của Sigma-Aldrich với độ tinh khiết tương ứng là $99,0\% \pm 1\%$, $\geq 98,5\%$, $\geq 99,0\%$. Dung dịch chuẩn gốc riêng rẽ nồng độ 500 ppm mỗi chất được pha từ lượng cân tương ứng, 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.

- Các hoá chất dùng cho HPLC như axit axetic, axetonitrin, methanol (Merck).

- Thiết bị đo phổ hấp thụ phân tử UV - VIS 1601 PC - Shimadzu (Nhật Bản), bước sóng đo từ 190-900 nm, cuvet thạch anh có chiều dày 1cm.

- Hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu LC- 20A; Cột tách LiChrospherC18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

- Phần mềm Matlab 2016.

2.2. Thu thập mẫu và xử lý mẫu

- Thu thập mẫu chè

Các mẫu chè xanh có nguồn gốc rõ ràng, lấy trực tiếp tại nơi trồng và chế biến thuộc các tỉnh Thái Nguyên (36 mẫu), Lâm Đồng (17 mẫu), 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)).

- Xử lý mẫu chè

Lấy chính xác ($\pm 0,0001$ g) cỡ 0,5gam chè khô (đã giữ trong bình hút ẩm) vào 50,00mL nước sôi và duy trì nhiệt độ 100°C trong 5 phút. Sau đó lọc thu được dịch lọc chè lần thứ 1. Tiếp tục cho 50,00mL nước sôi vào bã chè và duy trì nhiệt độ 100°C trong 5 phút, lọc thu được dịch lọc chè lần thứ 2. Hỗn hợp dịch lọc chè của 2 lần trên được định mức đến 100,00 mL thu được dung dịch A.

+ Chuẩn bị mẫu cho phép đo phổ UV-Vis: Lấy 1,00 mL dung dịch A cho vào bình định mức dung tích 25,00 mL, thêm nước cất đến vạch mức. Đo độ hấp thụ quang của các dung dịch trong khoảng bước sóng từ 240 – 310nm và ghi lại số liệu dưới dạng file excel, độ phân dải phổ 1nm.

+ Chuẩn bị mẫu cho phép đo HPLC: dung dịch A sau khi lọc qua màng lọc 0,25 μ m được bơm vào hệ thống sắc ký HPLC và tiến hành ghi sắc ký đồ trong điều kiện với dung môi pha động là acetonitrin: dung dịch kali dihidrophotphat (pH=3,0) theo tỉ lệ thể tích (15:85 v/v); tốc độ dòng pha động 1,2 ml/phút; thể tích vòng mẫu 20 μ L; detector UV bước sóng đo 271nm [2].

2.3. Phương pháp phân tích số liệu

Trong nghiên cứu này, phương pháp bình phương tối thiểu từng phần (PLS) được sử dụng để tính toán trên các tập dữ liệu mới với các cấu tử chính (PC). Phương pháp PLS xử lý trên 2 tập ma trận nồng độ và ma trận tín hiệu để tìm ma trận trực giao T tối ưu hóa tập số liệu.

Để đánh giá mức độ ảnh hưởng của nền mẫu đến tín hiệu phân tích đồng thời của 3 cấu tử làm sai lệch kết quả phân tích, một mô hình hồi quy đa biến phi tuyến tính sử dụng mạng neuron nhân tạo (ANN). Dữ liệu đầu vào là ma trận độ hấp thụ quang

(kích thước 44x71) của 44 mẫu chuẩn (chứa 3 chất phân tích) được đo trong vùng phổ 240-310 nm với 71 bước sóng tiến hành ghi phổ. Ma trận dữ liệu đầu ra (44x3) là nồng độ của các chất phân tích trong 44 dung dịch mẫu chuẩn chứa 3 cấu tử cần phân tích. Độ đúng của mô hình được kiểm tra với ma trận độ hấp thụ quang của mẫu kiểm tra (9x71) với 9 mẫu kiểm tra và 71 bước sóng đo độ hấp thụ quang. Mạng nơron sẽ chạy với 71 nút đầu vào (71 bước sóng) và 3 nút đầu ra (3 chất phân tích).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1: Hàm lượng TB, TP và CF trong các mẫu chè (xác định bằng pháp HPLC) dùng để xây dựng mô hình hồi qui đa biến

Mẫu	Hàm lượng (%)			Mẫu	Hàm lượng (%)		
	Theobromin	Theophyllin	Cafein		Theobromin	Theophyllin	Cafein
1	0,26	0,33	3,57	28	0,34	0,36	2,70
2	0,29	0,44	4,55	29	0,25	0,43	3,21
3	0,25	0,36	5,21	30	0,29	0,53	6,18
4	0,42	0,49	4,40	31	0,26	0,40	2,85
5	0,25	0,33	5,27	32	0,58	0,54	4,25
6	0,43	0,45	4,73	33	0,45	0,43	4,94
7	0,37	0,32	5,11	34	0,60	0,43	4,40
8	0,55	0,27	5,81	35	0,36	0,46	4,74
9	0,33	0,24	7,94	36	0,35	0,36	4,42
10	0,54	0,41	5,09	37	0,21	0,21	1,83
11	0,34	0,18	4,06	38	0,11	0,14	1,80
12	0,16	0,03	3,17	39	0,36	0,13	2,18
13	0,39	0,18	3,05	40	0,37	0,27	2,46
14	0,32	0,44	5,07	41	0,24	0,25	2,10
15	0,28	0,39	4,71	42	0,51	0,30	2,36
16	0,46	0,48	5,65	43	0,20	0,34	1,79
17	0,37	0,39	5,60	44	0,10	0,22	1,85
18	0,33	0,44	5,63	45	0,07	0,30	0,97
19	0,45	0,50	7,02	46	0,31	0,33	3,33
20	0,45	0,49	6,80	47	0,18	0,20	1,38
21	0,49	0,55	5,50	48	0,41	0,38	3,52
22	0,51	0,68	7,77	49	0,20	0,41	2,72
23	0,42	0,49	6,25	50	0,25	0,33	2,39
24	0,34	0,69	7,70	51	0,42	0,47	4,53
25	0,56	0,57	5,81	52	0,34	0,51	6,45
26	0,23	0,45	5,15	53	0,36	0,56	5,43
27	0,40	0,52	5,30				

3.2. Phổ hồng UV-Vis của các mẫu chè

Phổ UV-Vis (190-700 nm) của các mẫu chè thu được ở hình 1(a) cho thấy phần thông tin dữ liệu quan trọng tập trung trong vùng 190-500 nm với hai dải hấp phụ dễ thấy là các vùng từ 190-250 nm và 250-300 nm, còn một dải

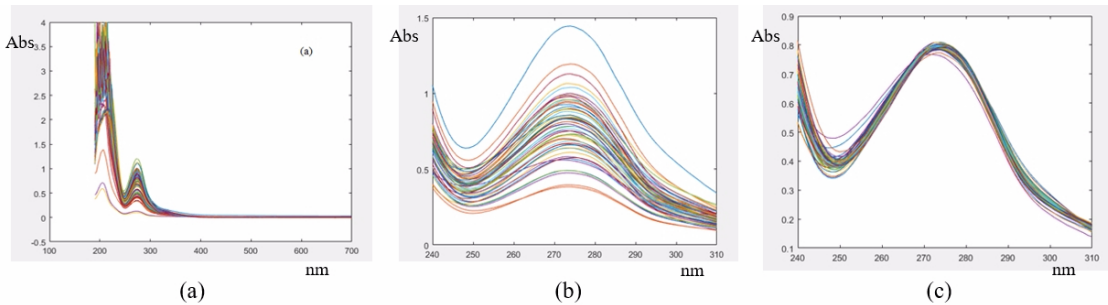
3.1. Xác định đồng thời CF, TB, và TP trong mẫu chè bằng phương pháp HPLC

Tiến hành xác định nồng độ CF, TB, và TP trong 53 mẫu chè bằng phương pháp HPLC theo quy trình đã nêu ở mục 2.2, kết quả thể hiện ở bảng 1. Trong đó, các mẫu chè xanh Thái Nguyên có số thứ tự từ 1÷36, các mẫu chè xanh Lâm Đồng có số thứ tự từ 37÷53. Từ kết quả thực nghiệm cho thấy, hàm lượng ba xanthin trong các mẫu chè Thái Nguyên đều cao hơn so với các mẫu chè Lâm Đồng.

rộng khác xuất hiện khoảng 300-400 nm. Vùng lớn hơn 490 nm không chứa nhiều thông tin phân tích. Mặt khác, khi đo phổ của các dung dịch chuẩn CF, TB, TP thì nhận thấy xuất hiện các pic đặc trưng trong vùng 240-310nm. Do đó, chỉ cần chọn dữ liệu trong vùng phổ 240-

310nm để tiến hành định lượng CF, TB, TP trong các mẫu chè. Bằng cách tính toán phổ trung bình của bộ dữ liệu phổ với thuật toán

MC (*mean centering*), phổ tiền xử lý được chỉ ra ở hình 1(c).



Hình 1. Phổ hồng ngoại truyền qua (*Abs*- bước sóng (nm)) của các mẫu chè trước xử lý vùng phổ 190-700nm (a), vùng 240-310nm (b) và sau tiền xử lý bằng MC (c)

3.3. Xác định đồng thời CF, TB, TP trong mẫu chè sử dụng mô hình PLS

3.3.1. Xây dựng phương trình hồi qui đa biến tuyến tính

Phương trình hồi qui đa biến PLS xác định đồng thời CF, TB, TP trong các mẫu chè được xác lập dựa trên ma trận hàm lượng của 44 mẫu chè chuẩn là các mẫu thực tế có hàm lượng các chất được xác định theo phương pháp HPLC. Ma trận tín hiệu đo của 44 mẫu là độ hấp thụ quang trong vùng phổ từ 240-310nm. Dùng câu lệnh tìm số cấu tử chính trong phần mềm Matlab thì thấy rằng với 15 PC (chiếm 99% lượng thông tin của tập số liệu) thì có thể phản ánh đầy đủ bản chất tập số liệu thay vì dùng đầy đủ 71 PC từ kết quả đo. Do đó mô hình hồi qui sẽ được tính toán với không gian mới 15 trục của tập số liệu và ma trận nồng độ đã xây dựng.

3.2.2. Đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi qui đa biến PLS

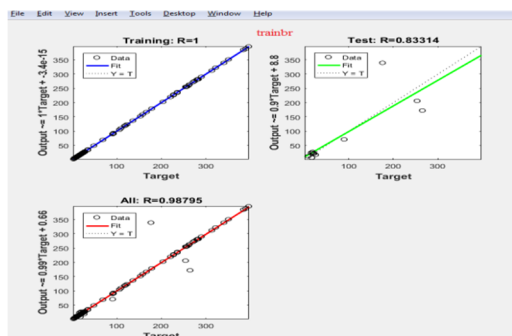
Một ma trận hàm lượng của 9 mẫu chè với hàm lượng ba xanthin đã biết trước bằng phương pháp HPLC được dùng để kiểm chứng tính phù hợp của mô hình hồi quy. Sai số của mô hình PLS được trình bày trong bảng 2. Kết quả cho thấy sai số của mô hình là lớn và không chấp nhận được trong phân tích định lượng chất. PLS là mô hình hồi quy đa biến tuyến tính nên khi làm việc với các mẫu có tương tác chưa biết của chất phân tích với nền mẫu cũng như ảnh hưởng của nền mẫu đáng kể thì sai số của phép đo tương đối lớn. Do đó cần phải xây dựng một mô hình mới phi tuyến tính để khắc phục những hạn chế của mô hình PLS.

Bảng 2. Sai số tương đối của mô hình PLS

Mẫu	Sai số tương đối (%)		
	TB	TP	CF
28	28,0	-5,9	12,8
29	10,5	-77,1	-55,8
30	69,8	12,1	-14,6
31	17,3	-44,2	-55,3
32	-34,9	-20,1	-1,2
33	0,7	18,9	35,7
34	-12,5	36,9	44,8
35	7,5	17,2	30,7
36	32,4	53,6	44,7

3.3. Xác định đồng thời CF, TB, TP trong mẫu chè sử dụng mô hình ANN

Trong nghiên cứu này, mô hình mạng nơron lan truyền thẳng đa lớp với các hàm có sẵn trong phần mềm để kết nối các neuron, cho mô hình học, ghi nhớ và luyện nhiều lần, cuối cùng đầu ra của nơron (outputs) là giá trị hàm lượng được kiểm tra lại với ma trận đầu ra đã nhập vào mô hình. Các hàm luyện mạng neuron đa lớp lan truyền thông thường như Levenberg-Marquardt (*trainlm*), hàm luyện chuẩn hóa tự động Bayesian Regularization (*trainbr*) và hàm quy mô liên hợp Scaled Conjugate Gradient (*trainscg*) được khảo sát. Kết quả cho thấy với hàm luyện chuẩn hóa tự động – *trainbr* có hệ số tương quan giữa kết quả tính được theo mô hình và kết quả đã biết của các ma trận chuẩn, ma trận mẫu kiểm tra và tính chung cho cả hai mô hình lần lượt là 1; 0,883 và 0,988 là khá tốt (hình 2).



Hình 2. Hệ số hồi quy của các hàm lượng xanthin tính được theo mô hình ANN sử dụng hàm trainbr và hàm lượng đã biết.

Bảng 3. Sai số tương đối của mô hình ANN

Mẫu	Sai số tương đối (%)		
	TB	TP	CF
28	-16,7	7,4	8,0
29	6,5	15,6	-10,6
30	-67,3	3,6	-21,7
31	18,0	15,1	15,0
32	28,9	12,1	-7,1
33	26,5	-0,3	12,0
34	18,1	13,6	10,5
35	43,2	-2,7	0,2
36	-23,6	-21,3	-15,5

Như vậy, bằng việc sử dụng mô hình ANN, sai số tương đối của hàm lượng tìm lại được so với hàm lượng ban đầu đã nhỏ hơn phương pháp PLS (chỉ còn khoảng 10%) chứng tỏ thuật toán ANN là giải pháp tối ưu để giải quyết các bài toán xác định đồng thời các cấu tử trong cùng hỗn hợp khi có ảnh hưởng phức tạp của nền mẫu. Tuy nhiên, do bộ mẫu chuẩn để xây dựng mô hình còn rất ít nên kết quả này vẫn chưa phải tốt nhất (như 2 mẫu của cấu tử theobromin có sai số rất lớn). Nếu tăng số mẫu chuẩn để luyện mạng nơron nhân tạo lên khoảng vài trăm mẫu sẽ cho phép xác định nhanh các chất mà không phải tách loại trước khi phân tích.

4. KẾT LUẬN

Bằng cách sử dụng mô hình hồi quy tuyến tính PLS và hồi quy phi tuyến tính ANN có thể xác định đồng thời 3 xanthin trong các mẫu chè xanh bằng phương pháp UV/VIS trên cơ sở đo trực tiếp độ hấp thụ quang của dịch chiết các mẫu chè mà không cần tách loại tanin ra khỏi nền mẫu và tách chúng ra khỏi nhau nhờ sử dụng mẫu chuẩn là mẫu thực có kết quả hàm lượng các chất phân tích theo phương pháp HPLC. Tuy nhiên, sai số thu được từ mô hình

PLS còn rất lớn so với mô hình ANN (chỉ khoảng 10%). Đây là một kỹ thuật phân tích nhanh, chuẩn bị mẫu đơn giản, không cần phá hủy mẫu phân tích, chi phí thấp do không tốn dụng cụ hóa chất (như phương pháp phân tích truyền thống HPLC), hạn chế được các sai số trong quá trình chuẩn bị mẫu nên có thể mở rộng để phân tích nhanh hàm lượng chất trong các mẫu phức tạp mà không phải xây dựng bộ mẫu chuẩn tự tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Hữu Hợp (1983), Hóa sinh chè, Đại học Bách khoa Hà Nội.
2. Chen, C. N., Liang C. M., Lai J. R., Tsai J. R., Tsay Y. J., Tsai S. J., Lin J. K. *Capillary electrophoretic determination of theanine, caffeine, and catechins in fresh tea leaves and oolong tea and their effects on rat neurosphere adhesion and migration*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7495-7503 (2003).
3. S. Branislava, D. Vukosava, G. Nevena, "Simultaneous HPLC determination of caffeine, theobromine, and theophylline in food, drinks, and herbal products", *Journal of Chromatographic Science*, Vol.46, 144-149 (2008).
4. A. Meyer, T. Ngiruwonsanga, G. Henze, Fresenius J, "Determination of adenine, caffeine, theophylline and theobromine by HPLC with amperometric detection", *Anal. Chem.*, 284-356 (1996).
5. Q.C. Chen and J. Wang, "Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography", *Journal of Chromatography*, **A 937**, 57-64 (2002).
6. L. M. Leticia, L. P. Luis, G. C. Rosalinda, *Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares*, *Analytica Chimica Acta*, **493**, 83-94 (2003).
7. Huck.C. W, Guggenbichler.W, Bonn.G. K "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(2005).
8. V. Taito, H. Koskela, Y. Hiltunen, M. A. Korpela, *Application of quantitative artificial neural network analysis to 2D NMR Spectra of hydrocarbon mixtures*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **42**, 1343-1346 (2002).