

## PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ACRYLAMIDE TRONG TRÀ THÀNH PHẨM TẠI VIỆT NAM VÀ TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH SAO CHÈ SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT

Đến tòa soạn 15-10-2018

**Mai Thị Ngọc Anh**

*Khoa Hóa học, ĐH Khoa học tự nhiên, ĐH Quốc gia Hà Nội*

**Phạm Quốc Trung, Đinh Thị Cúc, Đào Hải Yến, Lê Trường Giang**

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

### SUMMARY

#### DEVELOPMENT OF ACRYLAMIDE ANALYSIS METHODS IN TEA IN VIETNAM AND OPTIMIZATION OF GREEN TEA ROASTING PROCESS USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

*Residues of Acrylamide (AA) in green tea and tea products were determined using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to study their formation during green tea roasting process. Acrylamide (AA) has been found in various teas. This study was focussed on optimizing the roasting conditions using Central Composite Design (CCD) to produce superior quality tea products with low concentration of acrylamide. The roasting conditions used were temperatures in the range of 120°C to 200°C and time ranging from 15 min to 40 min. Roasting conditions significantly ( $p < 0.005$ ) affect the concentration of AA in tea. Hence, the optimized roasting conditions were able to produce high quality tea products.*

**Keywords:** *Acrylamide, tea, LC – MS/MS, solid-phase extraction.*

### 1. MỞ ĐẦU

Có rất nhiều loại đồ uống khác nhau, và trà có thể nói là thức uống lâu đời nhất của thế giới chỉ sau nước. Không chỉ với hương vị, mùi vị hấp dẫn mà trà còn mang đậm bản sắc văn hóa trong đời sống. Cùng một cây trà nhưng với phương thức chế biến khác nhau, trồng ở những vùng miền khác nhau sẽ cho những loại trà khác nhau. Trong trà có chứa nhiều các chất có hoạt tính sinh học cao như polyphenol, catechin [1]. Trong những thập kỷ qua lợi ích từ trà đã được chứng minh rất nhiều như chống ung thư, tim mạch, các bệnh thoái hóa thần kinh và một số bệnh khác [2,3]. Cũng chính vì thế, mà đã xuất hiện nhiều công trình nghiên cứu [4-9] về trà, đặc biệt là các chất độc phát

sinh trong quá trình chế biến như Acrylamide.

Acrylamide là một chất độc thần kinh và là một trong những chất có khả năng gây bệnh ung thư. Nó được hình thành qua phản ứng Maillard, một phản ứng rất phổ biến xảy ra hầu như khắp nơi trong thực phẩm, đặc biệt là khi chế biến ở nhiệt độ cao như rang, nướng, chiên, rán.

Acrylamide được hình thành trong quá trình gia nhiệt thông qua phản ứng Maillard [10,11] giữa các đường khử và asparagine [11,12]. Các yếu tố như nồng độ ban đầu của tiền chất, tỷ lệ của chúng và các điều kiện phản ứng (thời gian gia nhiệt, nhiệt độ, độ ẩm trong nguyên liệu thô, pH, các chất phụ gia,...) được chứng minh có ảnh hưởng đến mức độ acrylamide tìm thấy

trong thực phẩm chế biến nhiệt. Hơn nữa, lượng Acrylamide được hình thành không chỉ phụ thuộc vào loại thực phẩm mà còn phụ thuộc vào điều kiện bảo quản như nhiệt độ, thời gian lưu trữ của nguyên liệu thô, phương thức canh tác, tính chất đất và thời gian thu hoạch. Vì vậy, một trong các yếu tố quan trọng để giảm hàm lượng acrylamide trong thực phẩm chế biến nhiệt là ức chế phản ứng Maillard và chuẩn bị nguyên liệu thô sao cho chúng chứa hàm lượng tiền chất Acrylamide thấp nhất có thể.

Quá trình chế biến trà thành phẩm từ chè nguyên liệu là một trong những quá trình chế biến sử dụng nhiệt. Quy trình chế biến là một trong những yếu tố chính quyết định hương vị và chất lượng trà thành phẩm. Thật không may Acrylamide là một trong những chất độc được phát hiện có mặt trong rất nhiều loại trà thành phẩm ở nhiều nước trên thế giới. Cụ thể, tại Nhật Bản hàm lượng Acrylamide trong nhiều loại trà khác nhau đã được báo cáo bởi Bộ Nông nghiệp, Lâm nghiệp và Thủy sản Nhật Bản, theo nghiên cứu của tác giả Mizukami và các cộng sự, hàm lượng Acrylamide trong trà xanh rang sao (roasted green tea) được tìm thấy ở mức cao nhất từ 190-1880 µg/kg, trong chè xanh nguyên liệu thấp hơn nhiều so với trà xanh rang sao (thấp hơn 100 µg/kg), trong trà đen và trà ô long ở mức nhỏ hơn 100 µg/kg, không phát hiện thấy là trong mẫu trà trắng<sup>[13]</sup>. Tại Trung Quốc tác giả Liu và các cộng sự<sup>[14]</sup> đã phân tích hàm lượng Acrylamide trong 30 mẫu trà bao gồm trà xanh, trà ô long, trà đen, trà trắng, trà vàng và trà Pu-erh. Kết quả cho thấy mức Acrylamide trong tất cả các mẫu đều nhỏ hơn 100 µg/kg, trong đó bốn loại trà đen, trà ô long, trà trắng và trà vàng nồng độ Acrylamide khá thấp (< 20 µg/kg).

Ở Việt Nam cũng đã có một số công trình nghiên cứu về sự xuất hiện của Acrylamide trong thực phẩm, nhưng chủ yếu là trong các thực phẩm giàu tinh bột. Chính vì thế mà trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phát triển phương pháp phân tích hàm lượng Acrylamide trong trà thành phẩm tại Việt Nam và tối ưu hóa quá các điều kiện về thời gian và

nhiệt độ trong bước sao chè, là hai yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hàm lượng các chất Acrylamide sinh ra trong quá trình chế biến.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Hóa chất và thiết bị

+ **Hóa chất và dung môi:** Chất chuẩn Acrylamide và chất nội chuẩn<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-Acrylamide (<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-AA), các dung môi axit fomic, metanol, axetonitrin, và hóa chất magie sunfat, natri clorua, của hãng Merck với độ tinh khiết 99.5%.

+ **Thiết bị:** Máy sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC - MS/MS) dùng phân tích cho Acrylamide của hãng Thermo cho Acrylamide, cột sắc ký C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm, Waters, Ireland). Cột sắc ký C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm, Waters, Ireland).

### 2.2. Thu thập mẫu

Các mẫu trà thành phẩm phổ biến trên thị trường Việt Nam được thu thập để phát triển phương pháp phân tích và đánh giá mức độ nhiễm Acrylamide trong mẫu trà thành phẩm. Các mẫu trà thành phẩm phổ biến là trà xanh (10 mẫu), trà đen (5 mẫu), trà ô long (7 mẫu).

Búp chè xanh nguyên liệu dùng trong thí nghiệm nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến mức độ hình thành Acrylamide trong sản phẩm trà thành phẩm sử dụng mô hình bề mặt đáp ứng RSM được thu mua tại vườn chè ở Thái Nguyên. Rửa qua, để ráo nước và bắt đầu cho chè vào sao ở các giai đoạn nhiệt độ và thời gian khác nhau. Nhiệt độ được khảo sát ở các mức 100°C, 120°C, 200°C và thời gian sao chè là :15 phút, 25 phút, 45 phút. Sao chè được thực hiện bằng nguồn nhiệt là bếp điện.

### 2.3. Xử lý mẫu

Phương pháp xử lý mẫu Acrylamide được phát triển dựa trên phương pháp của Liu và Chen<sup>[15]</sup>. Quy trình xử lý mẫu sau khi đã được tối ưu như sau: Mẫu được trộn đều bằng máy vortex với tốc độ 1500 rpm ở 25°C trong 20 phút; thêm 10 mL axetonitrin, 4 g magie sunfat khan và 0.5 g muối NaCl vào ống li tâm. Mẫu được vortex trong 3 phút sau đó ly tâm với tốc độ 9000 rpm trong 10 phút. Lưu mẫu ở nhiệt độ 4°C trong vòng 15 phút, dịch chiết được tách thành 3 lớp: lớp axetonitrin có chứa

Acrylamide nằm phía trên, nền mẫu nằm ở giữa, phía dưới là lớp muối và cặn rắn. Chuyển 9 mL acetonitrin vào bình định mức 50 mL và dùng UPW định mức đến vạch. Sau khi định mức, dung dịch được làm sạch bằng cột chiết pha rắn Oasis MCX SPE cartridge. 50 mL dung dịch được tải qua cột SPE sau khi được hoạt hóa lần lượt bằng 2 mL MeOH và 2 mL UPW. Acrylamide được lưu giữ trên cột SPE, rửa giải bằng 3 mL MeOH và sau đó thổi khô bằng khí N<sub>2</sub>. Hòa tan bằng 1 mL UPW, lọc qua màng 0.22 µm để đem phân tích.

**2.4. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa cho quá trình rang sao chè nguyên liệu**

Các yếu tố ảnh hưởng đến mức độ hình thành Acrylamide trong quá trình sao chè nguyên liệu chủ yếu là nhiệt độ và thời gian. Phương pháp mặt đáp ứng (RSM) là một trong những phương pháp dùng để đánh giá một cách tổng quát sự ảnh hưởng của các yếu tố độc lập đến một mục tiêu nào đó. Trong nghiên cứu này, thiết kế thí nghiệm có tâm CCD được sử dụng để đánh giá sự tác động 2 yếu tố đó là nhiệt độ (X<sub>1</sub>), thời gian (X<sub>2</sub>) đến việc tạo ra các hợp chất acrylamide (Y) trong quá trình sao lá chè xanh. Các biến X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> được bố trí thí nghiệm ở ba mức -1, 0, 1 giá trị thực nghiệm tương ứng được chỉ ra ở bảng 1. Phần mềm MODDE 12.1 được sử dụng để thiết kế ma trận thí nghiệm, tính toán các giá trị hồi quy và phân tích phương sai. Ma trận thực nghiệm được lặp lại 2 lần, số thí nghiệm cần thực hiện là 22. Quy hoạch thí nghiệm và kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Mối quan hệ giữa hàm mục tiêu Y và các biến (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>) được thể hiện bằng phương trình (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \sum x_{1i} + \beta_{11} \sum x_{1i}^2 + \beta_{1j} \sum x_{1i} x_{2j} \quad (1)$$

Với β<sub>0</sub> là hằng số; β<sub>1</sub>, β<sub>1j</sub> và β<sub>11</sub> lần lượt là hệ số tuyến tính và tương tác bậc 2.

*Bảng 1: Biến độc lập và mức thí nghiệm*

Ký hiệu	Biến	Mức thí nghiệm		
		-1	0	1
X <sub>1</sub>	Nhiệt độ (°C)	120	160	200
X <sub>2</sub>	Thời gian(phút)	10	25	40

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Kết quả tối ưu hóa các điều kiện sắc ký, khối phổ**

Để tìm được các điều kiện tối ưu cho việc phân tích Acrylamide cho các mẫu trà, chúng tôi đã tối ưu hóa các điều kiện sắc ký lỏng và điều kiện khối phổ MS/MS cho Acrylamide như sau:

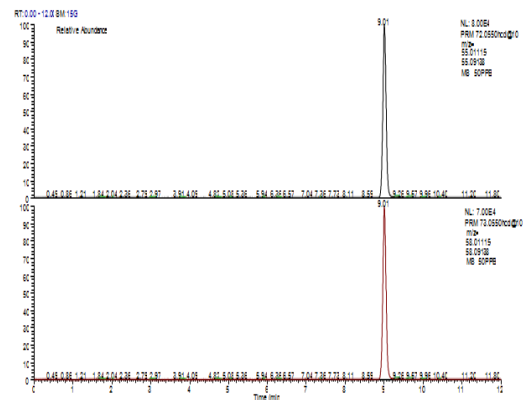
+ Điều kiện sắc ký lỏng: Nhiệt độ 30°C, hệ dung môi pha động H<sub>2</sub>O/MeOH/FA = 90/10/0.1. Tốc độ 0.3 mL/min, thể tích tiêm mẫu 10 µL.

+ Điều kiện khối phổ: Chế độ ESI<sup>+</sup> và PRM (chế độ theo dõi phản ứng song song) Chế độ PRM như sau: m/z 72 → 55 và 75 → 58 ở 10V cho AA và <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-AA được sử dụng để định lượng và m/z 72 → 44 ở 20V và 75 → 45 ở 10V được sử dụng để xác nhận cường độ đỉnh.

**3.2. Thẩm định phương pháp phân tích**

Để kiểm tra số liệu thu được khi phân tích AA, một số yếu tố như giới hạn phát hiện - LOD, giới hạn định lượng - LOQ, độ lặp lại, hiệu suất thu hồi được xem xét. LOD và LOQ lần lượt là 2 và 6 µg/L, chứng tỏ phương pháp phân tích có độ nhạy tốt, phù hợp để định lượng AA trong mẫu.

Độ lặp lại và độ tái lập của qui trình xử lý mẫu được đánh giá thông qua 22 mẫu lặp được tiến hành trong 7 ngày liên tiếp với độ lặp lại trong 7 ngày cho giá trị RSD = 3.3 - 10.2%, còn độ tái lập (n=7) cho giá trị RSD = 4.1 - 11.4%.



*Hình 1: Sắc ký đồ của Acrylamide*

Độ thu hồi tính theo phương pháp thêm chuẩn (sử dụng chuẩn đồng vị <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-AA). Giá trị độ thu hồi trung bình trong khoảng 90.3% -

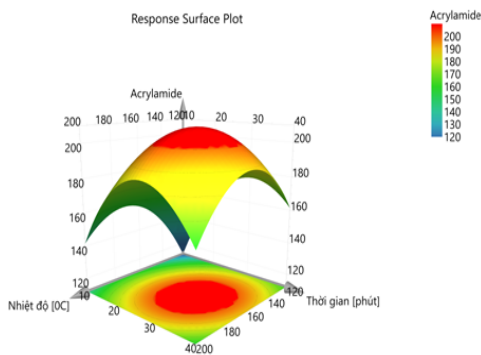


Kết quả phân tích thống kê ở bảng 4 cho thấy các biến nhiệt độ ( $X_1$ ), thời gian ( $X_2$ ) rất có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0.05$ ). Tuy nhiên, tính ý nghĩa của thời gian ( $X_2$ ), và  $X_1^2$  cao hơn hẳn điều này thể hiện ở giá trị P gần như bằng 0. Sau khi đã loại bỏ các hệ số không có ý nghĩa, hàm mục tiêu Y thu được ở phương trình (2).

$$Y = 207.53 + 6.70X_1 + 16.63X_2 - 29.35X_1^2 - 34.99X_2^2 - 8.31X_1X_2 \quad (2)$$

### 3.5. Mặt đáp ứng và các yếu tố ảnh hưởng chính

Mặt đáp ứng không gian 3 chiều thể hiện sự ảnh hưởng tổ hợp của hai yếu tố nhiệt độ, thời gian đến hàm mục tiêu được thể hiện ở hình 2.



Hình 2: Mặt đáp ứng 3 chiều của Acrylamide

Kết quả bảng 4 và hình 2 cho ta thấy cả nhiệt độ và thời gian đều có ảnh hưởng đến hàm lượng Acrylamide trong quá trình sấy chè xanh. Cụ thể kết quả phân tích thống kê cho thấy, yếu tố nhiệt độ ảnh hưởng 43.7% và yếu tố thời gian ảnh hưởng 56.3% đến sự hình thành Acrylamide trong quá trình sao chè xanh. Khi tăng nhiệt độ, thời gian sấy, hàm lượng Acrylamide tăng, tuy nhiên nếu nhiệt độ vượt quá 160°C và thời gian sấy cao hơn 25 phút thì hàm lượng của Acrylamide lại có xu hướng giảm. Nguyên nhân của quá trình này là do sự polyme hóa của Acrylamide khi thực hiện ở nhiệt độ cao và thời gian sấy lâu. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu xác định ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian sấy trên một số nền mẫu tương tự khác đã được công bố [16,17].

### 3.6. Phân tích phương sai ANOVA

Việc đánh giá mô hình thu được có phù hợp

với thực tế hay không là rất quan trọng. Phương pháp phân tích phương sai được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa thực nghiệm và kết quả dự đoán. Kết quả phân tích phương sai của hàm mục tiêu Y được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5: Kết quả phân tích phương sai mô hình Acrylamide

Acrylamide	DF	SS	MS (phương sai)	F	P	SD
Tổng	22	674739	30670			
Hằng số	1	654120	654120			
Tổng sửa đổi	21	20618,9	981,852			31,3345
Hồi quy	5	18778	3755,6	32,64	0,000	61,2829
Phần dư	16	1840,9	115,056			10,7264
Tính không phù hợp (Lỗi mô hình)	3	676,805	225,602	2,52	0,104	15,02
Lỗi thuần túy (Lỗi lặp lại)	13	1164,1	89,546			9,46288
	N = 22	Q <sup>2</sup> = 0,850	Cond. no. = 3,082			
	DF = 16	R <sup>2</sup> = 0,911	RSD = 10,73			
		R <sup>2</sup> adj. = 0,883				

Kết quả phân tích ở bảng 5 chỉ ra rằng mô hình hồi quy thu được phù hợp với thực nghiệm. Điều này thể hiện ở hệ số xác định ( $R^2$ ) và hệ số xác định tương đối ( $R^2$  adj) của mô hình đều rất cao gần bằng 1, cụ thể là  $R^2 = 0.911$ ,  $R^2$  adj=0.883. Tuy nhiên, việc đánh giá mô hình còn dựa vào giá trị P và chuẩn Fisher. Một điều đáng chú ý là giá trị P (tính không phù hợp) của mô hình lớn hơn 0.05, điều này chứng tỏ mô hình thu được rất phù hợp với thực tế. Bên cạnh đó giá trị F tính cũng cho kết quả tương tự ( $F_{\text{tính Acrylamide}} = 2.52 < F(0.95, 2, 13) = 3.81$ ).

## 4. KẾT LUẬN

Phát triển phương pháp phân tích Acrylamide trong trà thương phẩm ở Việt Nam đã được thực hiện và cho độ chính xác và độ tin cậy cao. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp (LOD và LOQ lần lượt là 2 và 6 µg/L), độ thu hồi cao (90,3-102,1%). Phương pháp quy hoạch thực nghiệm bậc 2 trực giao sử dụng trong nghiên cứu này, mô hình thu được chỉ ra sự ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian và sự tương tác giữa các yếu tố với nhau của chúng đến khả năng tạo thành Acrylamide trong trà thành phẩm.

Tuy nhiên việc Acrylamide có mặt trong các mẫu trà thành phẩm còn có thể do nhiều yếu tố như đất, nước, không khí. Do vậy nghiên cứu này có thể là tiền đề để chúng tôi tiếp tục

nghiên cứu sâu hơn về mức độ nhiễm acrylamide từ môi trường và quá trình chế biến vào các loại thực phẩm, đặc biệt là các thực phẩm có hoạt tính sinh học cao như trà.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài VAST.TĐ.TP.03/16-18.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mizukami Y, Sawai Y, Yamaguchi Y. *Simultaneous analysis of catechins, gallic acid, strictinin, and purine alkaloids in green tea by using catechol as an internal standard.* J Agric Food Chem, **2007**, 55(13):4957–64.
2. Hernández Figueroa TT, Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Muniz FJ. *The green tea, a good choice for cardiovascular disease prevention?* Arch Latinoam Nutr, **2004**, 54(4):380–94.
3. Yang CS, Hong J. *Prevention of chronic diseases by tea: possible mechanisms and human relevance.* Annu Rev Nutr, **2013**, 33:161–81.
4. Mizukami Y, Kohata K, Yamaguchi Y, et al. *Analysis of acrylamide in green tea by gas chromatography-mass spectrometry.* J Agric Food Chem, **2006**, 54(19):7370–7.
5. Qu Y, Liu C, Luo F, et al. *Electropolymerization of single-walled carbon nanotubes composited with polypyrrole as a solid-phase microextraction fiber for the detection of acrylamide in food samples using GC with electron-capture detection.* J Sep Sci, **2013**, 36(24):3889–95.
6. Lee S, Yoo M, Koo M, et al. *In-house-validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for survey of acrylamide in various processed foods from Korean market.* Food Sci Nutr, **2013**, 1(5):402–7.
7. Chen F, Yuan Y, Liu J, et al. *Survey of acrylamide content in traditional Chinese foods.* Food Addit Contam Part B Surveill, **2008**, 1(2), 85-92.
8. Cheng W, Kao Y, Shih D. *Validation of an improved LC/MS/MS method for acrylamide analysis in foods.* J Food Drug Anal, **2009**, 17:190–197.
9. Takatsuki S, Nemoto S, Sasaki K, et al.

- Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching.* Shokuhin Eiseigaku Zasshi, **2003**, 44(2):89–95.
10. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. *Food chemistry: acrylamide is formed in the Maillard reaction.* Nature, **2002**, 419:448–449.
11. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert M-C, Riediker S. *Food chemistry: acrylamide from Maillard reaction products.* Nature, **2002**, 419:449–450.
12. Friedman M. *Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review.* J Agric Food Chem, **2003**, 51:4504–4526.
13. MAFFJ. *The ministry of agriculture, forestry, and fisheries of Japan*, **2003**.
14. Liu J, Zhao G, Yuan Y, et al. *Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Food Chem **2008**, 108:760–7.
15. Liu J, Zhao G, Yuan Y, Chen F and Hu X. *Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Food Chemistry, **2008**, 108(2), 760-767.
16. Yuzo Mizukami, Mitsuru Yoshida and Hiroshi Ono. *Acrylamide elution from roasted barley grains into mugicha and its formation during roasting,* Food Additives & Contaminants: Part A, **2016**, 33:2, 225-235
17. Mizukami Y, Sawai Y, Yamaguchi Y. *Changes in the concentrations of acrylamide, selected odorants, and catechin caused by roasting of green tea.* J Agric Food Chem, **2008**, 56(6), 2154-2159.