

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI THEOBROMINE, THEOPHYLLINE VÀ CAFFEINE TRONG SẢN PHẨM CHÈ Ở MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

Đoàn Thị Bích Ngọc, Hoàng Trung Hiếu

Viện Nghiên cứu Công nghiệp rừng - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector UV-Vis để xác định đồng thời hàm lượng theobromine, theophylline (TB, TP và CF) và caffeine trong sản phẩm chè ở 4 tỉnh gồm có Phú Thọ, Thái Nguyên, Lào Cai và Nghệ An. Quá trình tách được thực hiện với cột LiChrospher 100 RP - 18 (5 μ m) sử dụng pha động (15/85) = (ACN/ nước deion) với tốc độ 0,8ml/phút và bước sóng phát hiện 271nm. Phương pháp cho giới hạn phát hiện của TB, TP và CF lần lượt là: 1,48ppm, 1,41ppm và 1,41ppm và giới hạn định lượng lần lượt là: 4,49 ppm, 4,27ppm và 4,29ppm. Kết quả phân tích mẫu thực cho thấy các địa điểm trồng chè khác nhau cho phần trăm khối lượng thành phần ba alkaloid trong chè là khác nhau và ba thành phần này chịu ảnh hưởng rất nhiều bởi phương pháp canh tác và phân bón cho chè.

Từ khóa: Caffeine, chè, HPLC, Theobromine, Theophylline

Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline in some kinds of tea produced in the North Viet Nam with using high-performance liquid chromatography (HPLC)

This paper is dealt with the results of analysis with using high-performance liquid chromatography (HPLC) to identify the content of theobromine, theophylline and caffeine (TB, TP and CF) in tea produced in the 4 provinces Phu Tho, Thai Nguyen, Lao Cai and Nghe An. The separation was performed with 100 LiChrospher column RP - 18 (5 μ m) using 15% ACN /85% deion water as the mobile phase at 0.8 ml/ min and absorbance wavelength at 271nm. The method has limit of detection for TB, TP and CF respectively: 1.48ppm, 1.41ppm and 1.41ppm and detection of quantitative respectively: 4.49 ppm, 4.27ppm and 4.29ppm. Real sample analysis results showed that the different locations for tea growing, the weight percentages of the three tea alkaloid are different and these three components greatly influenced by farming methods and fertilizers.

Keywords: Caffeine, HPLC, tea, theobromine, theophylline

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chè xanh 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. Việt Nam cũng đã trồng và sử dụng chè từ hàng nghìn năm nay. Chè được phân loại theo từng vùng xuất xứ. Tuy nhiên chúng ta vẫn chưa hiểu rõ được mối liên hệ giữa vùng trồng chè và hương vị của chè. Ở Việt Nam có một số vùng trồng chè có hương vị chè vượt trội hơn các vùng khác như là Thái Nguyên, Lào Cai, Yên Bái, Phú Thọ... Khi uống chè ta thấy hệ thần kinh trung ương và dạ dày được kích thích, đồng thời cảm thấy có vị đắng và tê tê ở đầu lưỡi. Thành phần chính dẫn đến các cảm giác đó nhóm alkaloid có trong chè bao gồm caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), theobromine (3,7-dimethylxanthine), và theophylline (1,3-dimethylxanthine). Trong đó, caffeine chiếm khoảng 2-5% lượng khô; theobromine và theophylline với hàm lượng khô nhỏ hơn nhiều so với hàm lượng của caffeine, chiếm khoảng 0,33% khối lượng chất khô (Hosseinzadeh, Deghan, 1999). Tuy vậy, vai trò của theobromine và theophylline trong dược tính của cây chè quan trọng hơn so với caffeine. Cấu trúc hình học và điện tử của các alkaloid phản ánh rõ dược tính của chúng.

Hiện nay, việc phát triển các phương pháp phân tích để xác định caffeine, theobromine, và theophylline trong các sản phẩm thực phẩm, dịch sinh học và đồ uống có caffeine hoặc sô cô la, cũng như trong quá trình sản xuất dược phẩm đang rất được quan tâm (Chen, Wang, 2002). Một số phương pháp sắc ký đã được đề xuất để xác định những methylxanthine này (Coco *et al.*, 2007). Tuy nhiên, chỉ có một vài phương pháp trong số

các phương pháp sắc ký đó cho phép sự tách biệt hoàn toàn của ba hợp chất, có yêu cầu xử lý mẫu trước khi đo, hoặc không chỉ ra các giới hạn phát hiện rất thấp.

Phần lớn các phương pháp xác định caffeine, theobromine và theophylline đều sử dụng sắc ký lỏng pha đảo. Hầu hết các phương pháp HPLC sử dụng detector UV để phát hiện, trong đó chu kỳ tách trong khoảng 7 đến 22 phút. Trong một nghiên cứu gần đây, Zambonin và đồng tác giả đã sử dụng một cột C18 thân hẹp (250mm × 2,1mm) để tách và xác định methylxanthine trong nước tiểu. Tuy nhiên, sử dụng tốc độ dòng 0,2 ml/phút và tỷ lệ pha động 20% MeOH, chu kỳ tách không được hoàn thành trong ít hơn 22 phút.

Mặt khác, phương pháp không tách sử dụng thiết bị đo đặc đơn giản và phổ biến hơn. Trên cơ sở đó, caffeine và theobromine có thể được xác định đồng thời trong cà phê và các loại trà bằng phổ UV sau khi sử dụng toán tin ứng dụng trong phân tích phù hợp (Lopez-Martinez *et al.*, 2003). Các nghiên cứu của Tzanavaras và đồng tác giả đã đề xuất một phương pháp HPLC mới để xác định đồng thời của ba methylxanthine: caffeine, theobromine và theophylline - trong các mẫu khác nhau, sử dụng cột sắc ký monolithic hẹp mới. Phương pháp này phân tích nhanh hơn và kinh tế hơn trong việc tiêu thụ các dung môi hữu cơ so với các nghiên cứu trước đó về RP-HPLC và (Chen *et al.*, 1998) phương pháp IC, nhanh hơn và nhạy hơn quá trình tách CE (Regan và Shakalisava, 2005). Chuẩn bị mẫu đơn giản và khả năng của việc xác định đồng thời của tất cả các chất phân tích trong một lần đo. Phương pháp được phát triển và được tối ưu hóa để áp dụng cho một loạt các ma trận mẫu bao gồm cà phê, trà, nước ngọt, đồ uống thảo dược, ca cao, sô cô la và dược phẩm.

Trong nghiên cứu này, một phương pháp phân tích đã được phát triển để xác định đồng thời caffeine, theobromine và theophylline trong chè bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (HPLC) với bộ phát hiện UV, cho phép bơm trực tiếp mẫu mà không cần xử lý trước, ngoại trừ một bước lọc. Quá trình này cho phép xác định các hợp chất trong ít hơn 12 phút với một giới hạn phát hiện thấp.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hóa chất và dụng cụ

a) Hóa chất

Chất chuẩn bao gồm: caffeine dạng bột của Sigma-Aldrich, theobromine dạng rắn với độ tinh khiết > 98,5% của Sigma-Aldrich, theophylline khan với độ tinh khiết > 99% dạng bột của Sigma-Aldrich. Dung môi: kênh B: Metanol độ tinh khiết > 99,9% của Merck, kênh C: acetonitrile độ tinh khiết > 99,9% của Merck, kênh D: nước deion. Hóa chất khác: dung dịch amoniac NH₃ 22%, Metanol độ tinh khiết > 99,9%.

b) Dụng cụ

Dụng cụ bao gồm: Pipet: 1, 2, 5, 10, 20ml, micro pipet 10-100 μ m, micro pipet 100-1000 μ m và đầu côn, lọ đựng mẫu 2ml dùng

cho máy chạy sắc ký, bình định mức: 5, 10, 50, 100ml, ống đong, phễu, giấy lọc.

Thiết bị

Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu gồm: cân phân tích chính xác đến 0,0001g, máy rung siêu âm, máy điều nhiệt, hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC của hãng Shimadzu, Nhật Bản gồm (Bộ loại khí dung môi, Degasser-DGU-14AM, van trộn dung môi FCV-10AL_{VP}, bơm dung môi bốn kênh LC-10AD_{VP}, bộ ổn nhiệt cột tách CTO-10 AS_{VP}, van bơm mẫu với thể tích vòng mẫu 20 μ l, detector UV-Vis SPD-M10A_{VP}, hệ điều khiển SCL-10A_{VP}, phần mềm điều khiển và xử lý số liệu LCMS solution Ver 3, cột sắc ký: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m)).

Chuẩn bị mẫu

a) Thu thập mẫu

Trong nghiên cứu này đã tiến hành phân tích caffeine, theophylline và theobromine trong các mẫu chè ở 1 số tỉnh miền núi Việt Nam: Phú Thọ, Thái Nguyên, Lào Cai và Nghệ An. Các mẫu lá chè và búp chè được phơi và sấy khô ở 60°C sau đó được nghiền thành bột mịn đủ dùng cho nghiên cứu và được lưu giữ trong túi hút ẩm ở Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam và Bộ môn Hóa phân tích trường ĐHKHTN.

Bảng 1. Bảng địa điểm lấy mẫu búp chè và lá chè

TT	Nơi lấy mẫu	Số lượng		Ngày lấy mẫu
		Lá chè	Búp chè	
1	Huyện Thanh Thủy - tỉnh Phú Thọ	4	6	23/04/2016
2	Huyện Thanh Ba - tỉnh Phú Thọ	1	1	04/09/2016
3	Huyện Đoan Hùng - tỉnh Phú Thọ	1	1	02/09/2016
4	Huyện Phong Hải - tỉnh Lào Cai	1	1	21/05/2016
5	Huyện Linh Dương - tỉnh Lào Cai	2	2	22/05/2016
6	Huyện Đại Từ - Thái Nguyên	4	10	16/04/2016
7	Huyện Thanh Chương - Nghệ An	4	4	01/09/2016

b) Chiết mẫu

Các mẫu bột chè cân chính xác 2g mỗi mẫu, sau đó được cho vào bình tam giác 500ml đã có 50ml nước deion và 4ml dung dịch NH₃ 1%/EtOH 60% ở 80°C. Sau khi rung siêu âm trong 10 phút để nguội dung dịch rồi thêm 50ml nước deion. Sau đó, dung dịch được lọc qua giấy lọc rồi lọc qua màng lọc 0,25µm. Dung dịch mẫu thu được được pha loãng theo tỷ lệ thích hợp để đo bằng máy HPLC. Các mẫu phân tích sau khi chiết được bảo quản trong tủ lạnh ở 20°C không quá 2 ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sắc ký lỏng là một kỹ thuật tách chất dựa trên sự tổ hợp của nhiều quá trình vừa có tính chất hoá học lại vừa có tính chất lý học. Nó là những cân bằng động xảy ra trong cột sắc ký giữa pha tĩnh và pha động, là sự vận chuyển và phân bố lại liên tục của các chất tan (hỗn hợp mẫu phân tích) theo từng lớp qua chất nhồi cột (pha tĩnh) từ đầu cột tách đến cuối cột tách.

Để xác định đồng thời theobromine, theophylline và caffeine bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, cần thực hiện các nội dung sau:

- Tìm điều kiện tối ưu của phương pháp sắc ký lỏng để xác định đồng thời theobromine,

theophylline và caffeine: Chọn thể tích vòng mẫu, bước sóng detector, pha tĩnh, pha động (tỷ lệ pha động và thành phần pha động).

- Khảo sát điều kiện chiết mẫu: thời gian chiết, nhiệt độ chiết, dung môi chiết, lượng dung dịch NH₃ 1%/etanol 60%.

- Đánh giá phương pháp phân tích: Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện LOD, giới hạn định lượng LOQ, độ chụm (độ lặp lại), độ đúng (độ chệch, độ thu hồi).

- Áp dụng phương pháp được xây dựng để xác định caffeine, theobromine và theophylline trong các mẫu lá chè, búp chè ở vùng núi phía Bắc Việt Nam như ở tỉnh Lào Cai, Thái Nguyên, Phú Thọ và, Nghệ An....

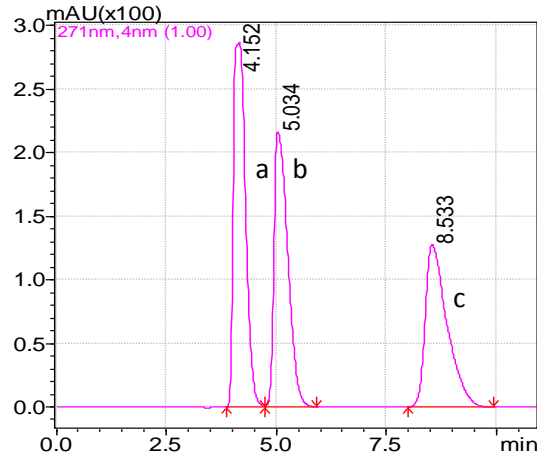
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát các điều kiện tối ưu xác định đồng thời TB, TP, và CF trong chè

Để tìm được các điều kiện tối ưu cho quá trình sắc ký đối với theobromine, theophylline và caffeine. Chúng tôi đã khảo sát bước sóng tối ưu, thành phần pha động, tốc độ pha động. Và để tìm điều kiện tối ưu trong quá trình chiết mẫu, các nghiên cứu khảo sát về thời gian chiết, nhiệt độ chiết, dung môi chiết và lượng dung dịch NH₃ 1%/EtOH 60% đã được thực hiện. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Điều kiện tối ưu xác định đồng thời TB, TP và CF trong chè

TT	Tên	Điều kiện tối ưu
1	Pha tĩnh	LiChrospher 100 RP - 18 (5µm)
2	Pha động	15% ACN/85% nước deion, tốc độ 0,8 ml/phút
3	Thể tích vòng mẫu	20 µl
4	Bước sóng	271 nm
5	Dung môi chiết	Nước deion
6	Thời gian chiết	15 phút
7	Nhiệt độ chiết	80°C
8	Dung dịch NH ₃ 1%/ Etanol 60%	4 ml



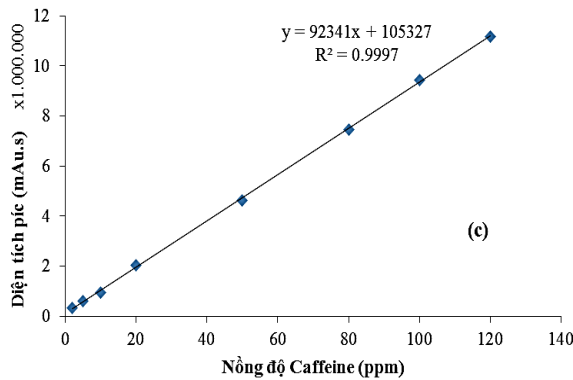
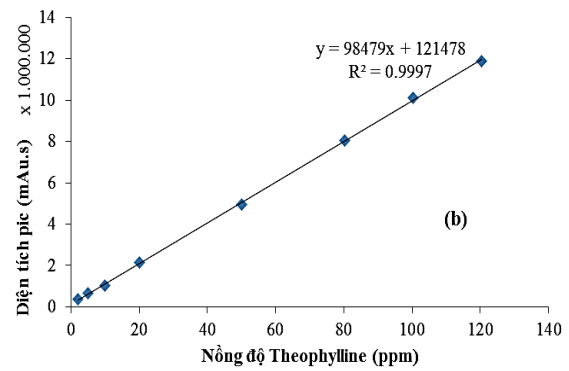
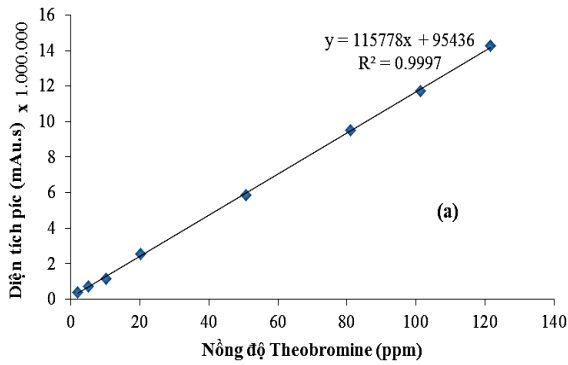
Hình 1. Sắc đồ tách (a) Theobromine, (b) Theophylline và (c) Caffeine

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

a) Xây dựng đường chuẩn

Từ các kết quả điều kiện tối ưu đã nêu ở bảng 2, tiến hành khảo sát khoảng tuyến tính của phép đo xác định đồng thời theobromine, theophylline và caffeine: pha một dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp của ba chất caffeine, theophylline và theobromine có nồng độ từ

2ppm đến 250ppm từ các dung dịch chuẩn. Các dung dịch chuẩn được pha trong nước deion. Từ các kết quả thu được sau khi phân tích sử dụng phần mềm MS Excell tìm khoảng tuyến tính và phương trình hồi quy thích hợp. Kết quả thu được khoảng tuyến tính trong khoảng 2ppm đến 120ppm được chỉ ra ở bảng và hình vẽ sau.



Hình 2. Đường chuẩn của (a) Theobromine, (b) Theophylline và (c) Caffeine

Bảng 3. Bảng giá trị đánh giá sai số hệ thống của các đường chuẩn

Chất	Phương trình hồi quy	Phương sai	F tính	F bảng
TB	$y = (116858 \pm 1493) x$	18115350247	1,87	4,39
	$y = (115778 \pm 1932) x + (95436 \pm 12732)$	9672623766		
TP	$y = (99865 \pm 1511) x$	18139933642	2,87	4,39
	$y = (98479 \pm 1580) x + (121478 \pm 102994)$	6329385023		
CF	$y = (93546 \pm 1360) x$	14646004210	2,62	4,39
	$y = (92341 \pm 1489) x + (105327 \pm 96870)$	5599083618		

Từ kết quả tính toán đều cho giá trị $F_{tính} < F_{bảng}$, như vậy sự khác nhau giữa giá trị a và giá trị 0 là không có ý nghĩa, hay có thể coi $a = 0$. Như vậy phương pháp tiến hành sắc ký không mắc sai số hệ thống (Tạ Thị Thảo, 2008). Vì vậy với mục tiêu nghiên cứu là

các mẫu chè nên có thể chọn điều kiện phân tích này.

Từ đường chuẩn ta xác định được giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ (Trần Thị Tuyết Thu *et al.*, 2012) của phương pháp theo bảng 4.

Bảng 4. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng theo phương trình hồi quy

TT	Chất	Hệ số góc b	Độ lệch chuẩn S_y	Giới hạn phát hiện (ppm)	Giới hạn định lượng (ppm)
1	Theobromine	115778	52031	1,48	4,49
2	Theophylline	98478	42089	1,41	4,27
3	Caffeine	92341	39587	1,41	4,29

b) Độ chụm và độ đúng của phương pháp

Độ chụm của phương pháp được biểu diễn dưới dạng sai số tuyệt đối SD hoặc sai số tương đối RSD % (Trần Cao Sơn, 2010). Độ đúng được xác định trên mẫu chè, thêm chuẩn tại 3 mức nồng độ 2ppm, 20ppm và 50ppm. Mỗi mức tiến hành làm lặp lại 4 lần. Tính độ thu hồi theo công thức sau:

$$R\% = \frac{C_{m+c} - C_m}{C_c} \times 100$$

Trong đó: R%: Độ thu hồi %

C_{m+c} : Nồng độ chất phân tích trong mẫu thêm chuẩn;

C_c : Nồng độ chuẩn thêm (lý thuyết);

C_m : Nồng độ chất phân tích trong mẫu thử.

Kết quả của độ chụm và độ đúng được đánh giá với giới hạn cho phép theo AOAC.

Bảng 5. Độ lặp của phương pháp trên mẫu chè

TT	Chất	Nồng độ (ppm)	SD	RSD (%)
1	Theobromine	9,06	93753,37	8,20
2	Theophylline	4,63	46099,19	7,35
3	Caffeine	84,41	439972,30	5,57

Phần trăm độ lệch chuẩn và độ lệch chuẩn tương đối RSD% của phương pháp đối với ba chất phân tích có giá trị từ 5,57 - 8,20% so sánh với giới hạn cho phép của AOAC nồng

độ khoảng 1ppm-100ppm, RSD% nằm trong khoảng 11% đến 5,3%. Vì vậy phương pháp này có độ lặp phù hợp với xác suất thống kê.

Bảng 6. Độ thu hồi của phương pháp phân tích

TT	Chất	Chuẩn thêm (ppm)	Nồng độ TB (ppm)	R (%)
1	Theobromine	0	8,75	0
		2	10,95	103,24
		20	27,96	90,30
		50	58,15	92,92
2	Theophylline	0	4,55	0
		2	6,39	94,04
		20	23,51	96,84
		50	52,00	96,93
3	Caffeine	0	78,99	0
		2	80,85	97,98
		20	96,14	90,39
		50	124,47	95,90

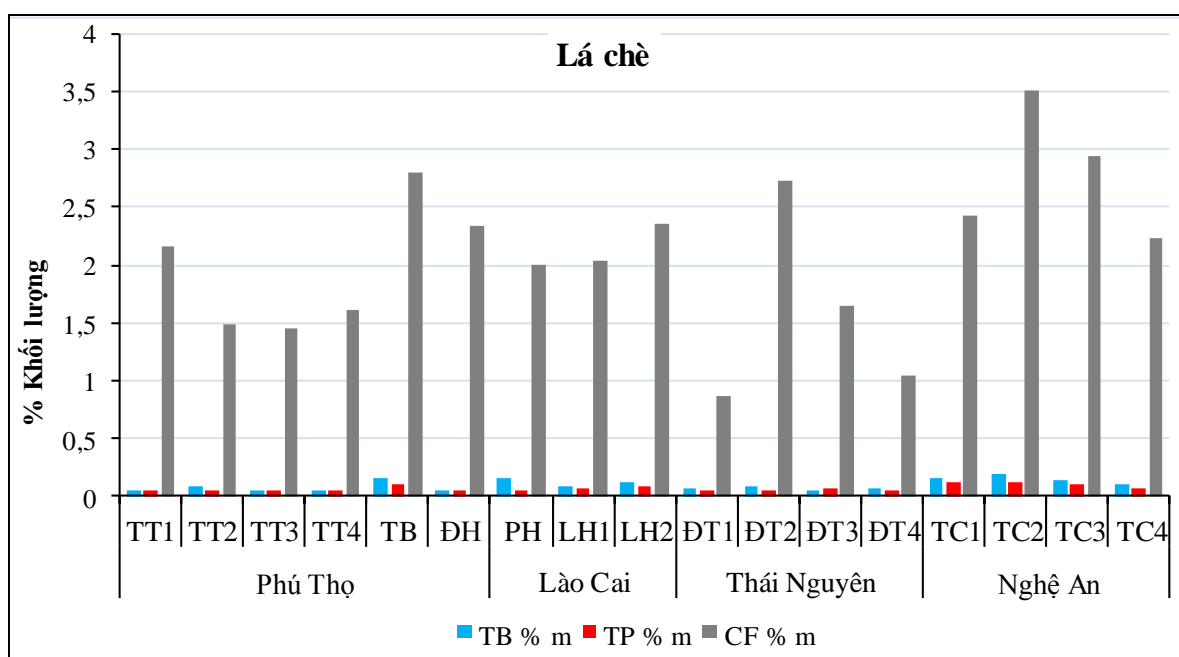
Độ thu hồi ở các nồng độ khác nhau có kỳ vọng khác nhau. Trong trường hợp phân tích các chất hàm lượng vết có thể tham khảo tiêu chuẩn của hội đồng châu Âu theo AOAC. Qua bảng số liệu 6 ta thấy độ thu hồi của phương pháp phân tích tại 3 điểm thêm chuẩn khác nhau của 3 chất phân tích nằm trong khoảng 90,30 đến 103,24%. Các giá trị này đều nằm trong khoảng giới hạn cho phép của AOAC nồng độ khoảng 1ppm-100ppm, RSD% nằm trong khoảng 80% đến 110%. Vì vậy khoảng

nồng độ khảo sát thì phương pháp phân tích có độ chính xác đáp ứng yêu cầu thống kê.

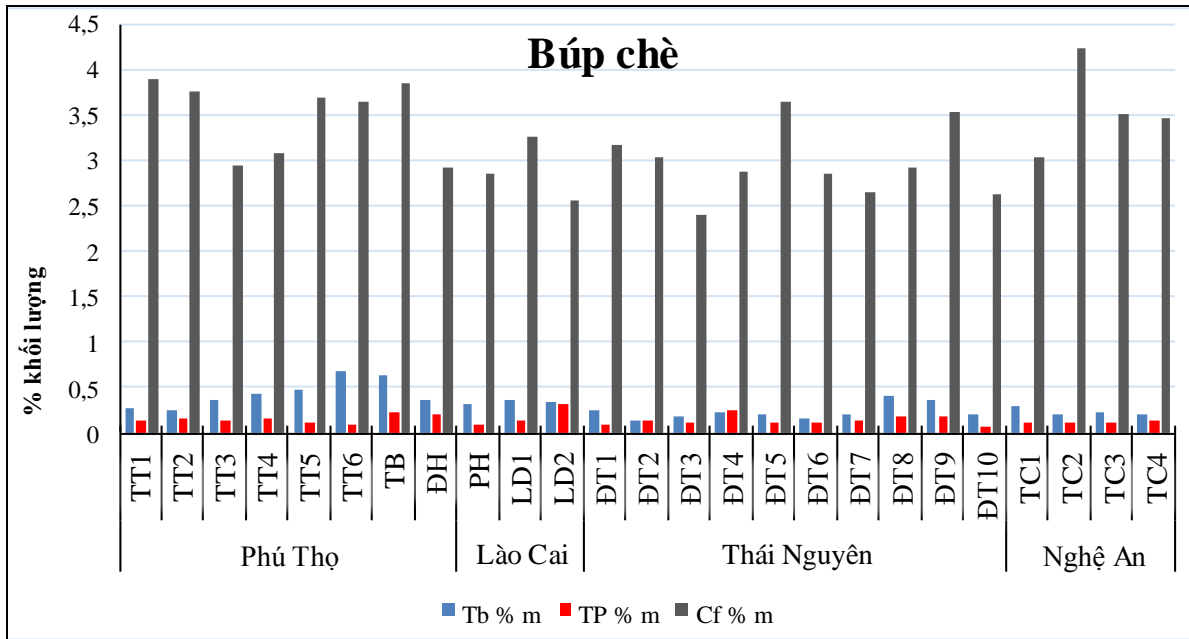
3.3. Kết quả phân tích mẫu thật

a) Phân tích mẫu lá chè

Tiến hành phân tích, đánh giá lượng caffeine, theophylline và theobromine trong các mẫu lá chè và búp chè ở các địa phương khác nhau. Kết quả phân tích các mẫu lá chè và búp chè được nêu ở hình sau.



Hình 3. Phần trăm khối lượng các alkaloid trong các mẫu lá chè



Hình 4. Phần trăm khối lượng các ankaloid trong các mẫu búp chè

Hiện nay, ở Việt Nam cây chè đã được phân bố rộng trên phạm vi cả nước. Những vùng trồng chè lớn chủ yếu trên các đất xám (Acrisols) phát triển trên phiến thạch sét, gonal và mica, sa thạch, phù sa cổ và đất đỏ (Feralsols) phát triển trên bazan (Trần Thị Tuyết Thu *et al.*, 2012). Đất trồng chè Việt Nam có phản ứng axit từ chua đến chua nhẹ, hàm lượng chất hữu cơ khoảng 1 - 2%, nghèo lân, kali, canxi, magiê và có hàm lượng sắt, nhôm cao. Ngoài ra đất trồng chè còn có thành phần cơ giới nặng, chủ yếu do được hình thành trên các đá mẹ giàu sét, cấu trúc kém và ít tơi xốp. Nhiều nghiên cứu cho thấy đất trồng chè của nước ta có hàm lượng chất hữu cơ ở mức thấp và dao động rộng từ rất nghèo đến trung bình (thường < 2). Ở những vùng trồng chè có điều kiện khí hậu thuận lợi cho sự tích lũy chất hữu cơ và ít bị xói mòn rửa trôi thì hàm lượng chất hữu cơ đạt ở mức khá. Hàm lượng chất hữu cơ trong đất trồng chè có sự khác nhau rất rõ giữa các nhóm đất khác nhau. Tại các vùng đất trồng chè có đầu tư thâm canh cao như ở Phú Thọ, Thái Nguyên, Lào Cai, Nghệ An có thực hiện biện pháp che phủ lâu năm đất đều có hàm lượng chất hữu cơ ở mức trung bình khá

đến rất giàu. Đối với những vườn chè quy mô hộ gia đình ở Phú Thọ có mức đầu tư thấp thì hàm lượng chất hữu cơ đất chỉ ở mức nghèo đến trung bình. Theo nghiên cứu của Trần Thị Tuyết Thu và đồng tác giả năm 2010, hàm lượng chất hữu cơ trong 3 mô hình thâm canh cao, trung bình và thấp ở vùng trồng chè Tân Cương, Thái Nguyên là 4,13%, 3,63% và 2,76%. Hàm lượng chất hữu cơ trong đất trồng chè của hộ gia đình ở Phú Thọ có mức đầu tư trung bình dao động từ 1,8% đến 2,81%. Cho thấy sự tích lũy hàm lượng chất hữu cơ trong đất trồng chè ở Việt Nam phụ thuộc chủ yếu vào kỹ thuật canh tác và hoạt động quản lý đầu vào cung cấp phân bón và nguồn chất hữu cơ cho đất. Vì vậy chất lượng đất ảnh hưởng rất nhiều đến chất lượng là thành phần các chất hóa học trong chè.

Đối với lá chè: Theo hình 3 cho thấy kết quả phần trăm khối lượng của 3 ankaloid là cao nhất ở Nghệ An với mẫu chè đo được ở mẫu TC2 đạt kết quả cao nhất là 0,191% theobromine, 0,119% thephylline và 3,517% caffeine. Và kết quả thấp nhất là đối với mẫu ĐT1 ở Thái Nguyên với 0,059% theobromine, 0,049% thephylline và 0,859% caffeine. Kết quả cũng

cho thấy tỷ lệ phần trăm ba alkaloid trong lá chè theo thứ tự giảm dần các tỉnh: Nghệ An > Lào Cai > Phú Thọ > Thái Nguyên. Hình 3 cũng chỉ ra rằng, tỷ lệ thành phần 3 alkaloid bị ảnh hưởng nhiều bởi phương thức trồng chè. Tại các địa điểm chè trồng tập trung có kết quả tỷ lệ phần trăm các alkaloid cao hơn khi trồng tại nhà. Nhưng đối với tỉnh Thái Nguyên mặc dù trồng tập trung nhưng lại cho kết quả hàm lượng các alkaloid thấp vì trong quá trình lấy mẫu, nhận thấy đất trồng chè ở khu vực này đã được canh tác lâu năm và bị thoái hóa nhiều so với các tỉnh khác mà chưa có phương pháp cải tạo đất hợp lý.

Đối với búp chè: Theo hình 4 cho thấy kết quả phần trăm khối lượng của caffeine cao nhất ở mẫu TC2 ở Thái Nguyên đạt kết quả cao nhất là 4,239% caffeine và thấp nhất là đối với mẫu ĐT3 ở Thái Nguyên với 2,391% caffeine. Trong khi đó, với theobromine cao nhất ở TT6 thuộc tỉnh Phú Thọ với 0,082% và thấp nhất ĐT2 ở Thái Nguyên 0,127%. Còn đối với theophylline cao nhất ở LD2 tỉnh Lào Cai với 0,307% và nhỏ nhất 0,072% ở ĐT10 tỉnh Thái Nguyên. Vì vậy tỉnh Thái Nguyên đều có kết quả tỷ lệ % ba alkaloid là nhỏ nhất. Kết quả cũng cho thấy tỷ lệ phần trăm ba alkaloid trong búp chè theo thứ tự giảm dần các tỉnh: Phú Thọ > Nghệ An > Lào Cai \approx Thái Nguyên. Hình 4 cũng chỉ ra rằng, tỷ lệ thành phần 3 alkaloid bị ảnh hưởng nhiều bởi phương thức trồng chè và ngược lại với kết quả phân tích mẫu lá chè. Đối với búp chè, tại các địa điểm chè trồng tập trung có kết quả tỷ lệ phần trăm các alkaloid thấp hơn khi trồng tại nhà. Đối với tỉnh Thái Nguyên mặc dù kết quả hàm lượng các alkaloid thấp vì trong quá

trình lấy mẫu, ta nhận thấy đất trồng chè ở khu vực này đã được canh tác lâu năm và bị thoái hóa nhiều so với các tỉnh khác mà chưa có phương pháp cải tạo đất hợp lý.

IV. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu xác định đồng thời theobromine, theophylline và caffeine trong mẫu chè ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC cho thấy phương pháp HPLC - UV - Vis có độ nhạy cao, với phương pháp xử lý mẫu đơn giản không gây ảnh hưởng đến môi trường và giảm chi phí phân tích. Kết quả phân tích mẫu thực: đã xác định được đồng thời hàm lượng TB, TP và CF trong các mẫu lá chè và mẫu búp chè ở 4 tỉnh Phú Thọ, Thái Nguyên, Lào Cai và Nghệ An. Kết quả phân tích mẫu thực cho thấy các địa điểm trồng chè khác nhau cho phần trăm khối lượng thành phần ba alkaloid trong chè là khác nhau và ba thành phần này chịu ảnh hưởng rất nhiều bởi phương pháp canh tác và phân bón cho chè. Tuy nhiên kết quả về số mẫu thực đánh giá trong nghiên cứu còn hạn chế và chưa phân tích được chính xác thành phần chất dinh dưỡng trong đất ảnh hưởng đến chất lượng chè. Vì vậy kết quả mới chỉ có ý nghĩa ban đầu định hướng cho nghiên cứu sâu hơn về thành phần các alkaloid trong chè ở các vùng miền khác nhau.

Đây là những nghiên cứu bước đầu để tạo tiền đề cho các nghiên cứu thành phần theobromine, theophylline và caffeine trong mẫu chè ở các vùng miền khác nhau từ đó xác định được nguồn gốc và mối tương quan của thành phần chè với chất dinh dưỡng trong đất trồng chè.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Q.C. Chen and J. Wang, 2002. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *J. Chromatogr. A* 937: pp.57-64.
2. Q.C. Chen, S.F. Mou, X.P. Hou, Z.M. Ni, 1998. *Anal. Chim. Acta* 371, 287.

3. Hosseinzadeh, H. and Deghan, R. 1999. Anti-Inflammatory activity of Purine Alkaloids. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 9, 18-19.
4. 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. L. Lopez-Martinez, P.L. Lopez-de-Alba, R. Garcia-Campos, L.M. De LeonRodriguez, 2003. *Anal. Chim. Acta* 493, 83.
6. F. Regan, Y. Shakalisava, 2005. *Anal. Chim. Acta* 540, 103.
7. D.S Trần Cao Sơn, Viện Kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, 2010. *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
8. Tạ Thị Thảo, giáo trình môn học, 2008. *Thống kê trong hóa phân tích*. Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN.
9. 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.
10. Paraskevas D. Tzanavaras, Constantinos K. Zacharis, Demetrius G. Themelis, 2010. Rapid determination of methylxanthines in real samples by high-performance liquid chromatography using the new FastGradient® narrow-bore monolithic column. *Talanta* 81 (2010) pp.1494-1501.
11. C.G. Zambonin, A. Aresta, F. Palmisano, *J. Pharm.* 2004. *Biomed. Anal.* 36, 621.

Người thẩm định: GS.TS. Hà Chu Chử