

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CAFEIN TRONG HẠT CÀ PHÊ CHÈ CATIMOR VÀ TRÀ HOA VÀNG (*Camellia chrysantha*)

Phạm Thị Chuyên, Trần Hồng Sơn, Lê Sỹ Bình
Trường Đại học Tây Bắc

Tóm tắt: Chúng tôi nghiên cứu hàm lượng cafein trong các mẫu hạt cà phê khô Catimor trồng tại Mai Sơn, Sơn La và trong các mẫu trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) trên thị trường. Sử dụng phương pháp HPLC định lượng được cafein trung bình trong 5 mẫu hạt cà phê khô là 1,18%, cafein trong 02 mẫu trà hoa vàng trên thị trường là 0,003% (HV-01) và 0,318% (HV-02).

Từ khóa: Cà phê catimor, Sơn La, trà hoa vàng, cafein.

1. MỞ ĐẦU

Cafein (1,3,7-trimethylxanthine) là một alkaloid thuộc nhóm purine, nó là chất kích thích có trong hơn trong 60 loài thực vật bao gồm cà phê, ca cao, trà v.v... Ngoài ra cafein cũng có mặt trong các loại thực phẩm công nghiệp như nước tăng lực, nước giải khát, v.v. Tuy nhiên, cafein cũng gây ra một số tác dụng phụ như tăng huyết áp, tăng nhịp tim [1]... Như vậy, một số người sử dụng sẽ thích loại cà phê hoặc trà có hàm lượng cafein cao, đắng và nguyên chất, nhưng một số người bị dị ứng hoặc “say” cafein sẽ thích uống cà phê hoặc trà không chứa/ chứa ít cafein. Do đó, việc định lượng cafein rất quan trọng. Mai Sơn, Sơn La là địa phương có diện tích cây cà phê lớn nhất tỉnh Sơn La với cơ cấu giống chủ yếu là cà phê chè Catimor. Catimor là sự lai tạo giữa cafe Timor (cà phê Timor được lai tạo từ cà phê Arabica và Robusta) và Caturra. Việc đánh giá chất lượng hạt cà phê một phần thông qua độ đắng của hạt do hàm lượng cafein chi phối. Năm 2016, Chamira Dilanka Fernando và Preethi Soysa xác định đồng thời caffeine và các catechin trong sản phẩm trà bằng HPLC [2]. Năm 2020, Stanislava Ivanova và cộng sự xác định Caffeine trong các thực phẩm chức

năng hỗ trợ giảm cân bằng phương pháp HPLC [3]. Tại Việt Nam, tác giả Phạm Cao Bách và cộng sự đã xác định cafein và các hoạt chất khác trong trà hoa vàng trồng tại Ba Chẽ, Quảng Ninh bằng HPLC [4]. TCVN 9723:2013, ISO 20481: 2008 cho phép xác định cafein trong các dạng cà phê bằng phương pháp HPLC. Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) đang là một loại trà được sử dụng phổ biến gần đây tại Việt Nam và được coi là “nữ hoàng các loại trà”. Trà hoa vàng nếu có nguồn gốc tự nhiên sẽ có vị rất thơm ngon, tuy nhiên hiện nay thị trường bày bán trôi nổi nhiều loại không rõ nguồn gốc, loại trà này uống vị không thơm, đắng nhẹ, việc phân tích cafein trong một số mẫu trà hoa vàng có ý nghĩa quan trọng đối với người tiêu dùng trong việc lựa chọn sản phẩm. Như vậy HPLC là phương pháp phổ biến và thích hợp để định lượng cafein.

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu hàm lượng cafein trong các mẫu nhân hạt cà phê Catimor trồng tại Mai Sơn, Sơn La và trong các mẫu trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) sấy khô trên thị trường. Nghiên cứu nhằm so sánh hàm lượng cafein trong các hạt cà phê khô tại vùng trồng cà phê khác nhau

ở huyện Mai Sơn, đồng thời so sánh hàm lượng cafein giữa trà hoa vàng và cà phê để đưa ra định hướng sử dụng đồ uống cho người tiêu dùng.

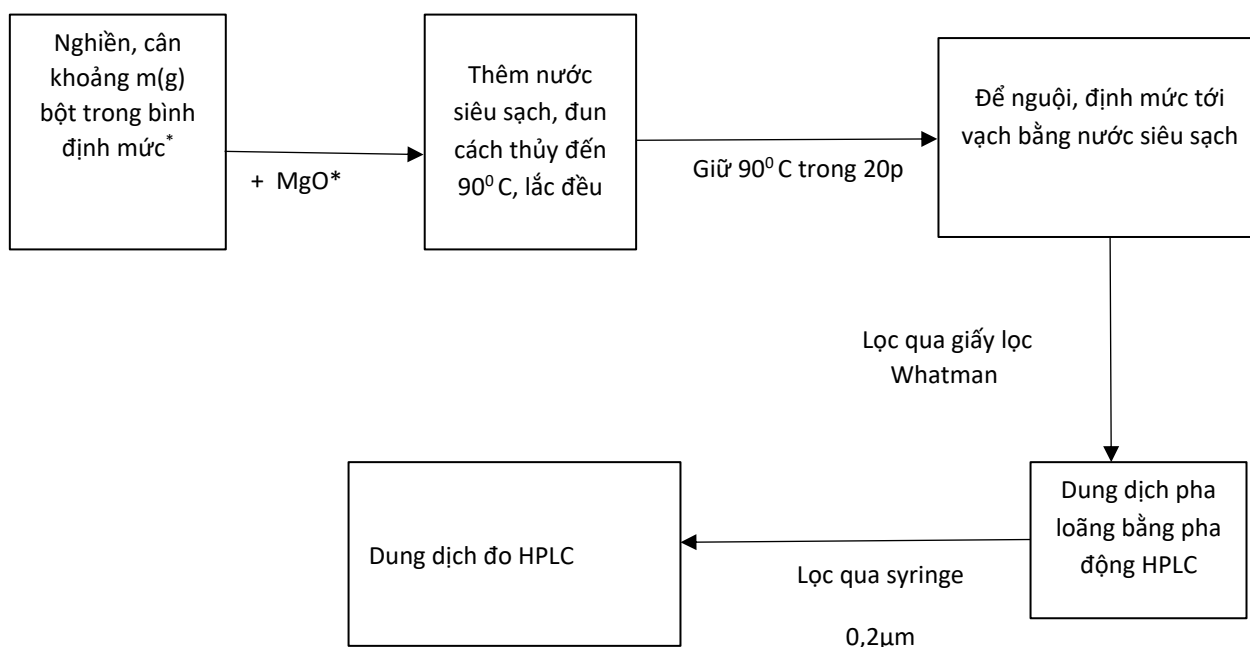
2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, hóa chất

Thiết bị: Máy rung siêu âm, khử khí, bể điều nhiệt, bộ hút chân không, máy đo độ ẩm.

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Model: Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technology – Đức), bơm dung môi 4 kênh áp suất 600 bar G7111B, thiết bị tiêm mẫu tự động G7129A, buồng điều nhiệt đa cột G7116A, detector mảng Di-ốt G7115A, cột phân tích Eclipse XDB-C18 4,6x250, 5 μ m Analytical.

Hóa chất: Cafein chuẩn tinh khiết phân tích dạng bột (Merk), nước đề ion, methanol dùng cho HPLC. Tất cả các dung dịch chuẩn cafein và dung dịch mẫu phân tích được pha bằng hỗn hợp nước- methanol (v/v=76:24) và lọc qua syringe 0,2 μ m trước khi phân tích HPLC.



Sơ đồ A: Tóm tắt quy trình xử lý mẫu

*: Tỷ lệ khối lượng mẫu/MgO phụ thuộc vào loại mẫu

2.2. Lấy mẫu và xử lý mẫu phân tích

- Các mẫu nhân hạt cà phê khô nguyên chất chưa rang được lấy ngẫu nhiên đại diện 05 mẫu tại các xã Chiềng Mung, Chiềng Ban, Chiềng Mai, Chiềng Chung, Chiềng Dong (bảng 2.1).
- Có 02 mẫu trà hoa vàng khô được mua từ chợ trung tâm – TP Sơn La và tại Quê Phong – Nghệ An (bảng 2.1).

Các mẫu hạt cà phê được xử lý theo TCVN 9723:2013 – “Cà phê và sản phẩm cà phê – Xác định hàm lượng cafein bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) – Phương pháp chuẩn”.

Các mẫu trà hoa vàng (hình 3.2) được xử lý theo TCVN 9744:2013 – “Chè và chè hòa tan dạng rắn – Xác định hàm lượng cafein – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao”
Quy trình xử lý mẫu theo các TCVN có thể tóm tắt theo sơ đồ A sau:

Bảng 2.1: Ký hiệu và vị trí lấy mẫu

Kí hiệu mẫu	Loại mẫu	Vị trí lấy mẫu
M1	Hạt cà phê khô nguyên chất	Chiềng Mung
M2	Hạt cà phê khô nguyên chất	Chiềng Ban
M3	Hạt cà phê khô nguyên chất	Chiềng Mai
M4	Hạt cà phê khô nguyên chất	Chiềng Chung
M5	Hạt cà phê khô nguyên chất	Chiềng Dong
HV-1	Trà hoa vàng sấy lạnh nguyên bông	Chợ trung tâm TP Sơn La
HV-2	Trà hoa vàng sấy nhiệt nguyên bông	Quế Phong – Nghệ An

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

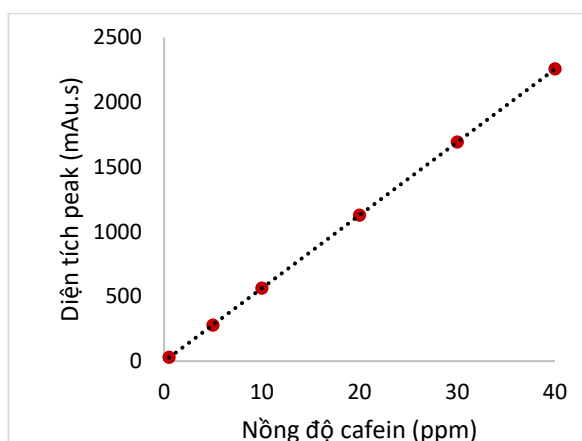
3.1. Khảo sát các điều kiện tối ưu phân tích cafein bằng HPLC

Các điều kiện chuẩn phân tích cafein bằng phương pháp HPLC đã được nêu rõ tại TCVN 9723:2013, tuy nhiên ứng với mỗi hệ thống HPLC khác nhau, một số điều kiện như bước sóng tối ưu, tỉ lệ pha động tối ưu và thời gian phân tích có thể thay đổi, do đó chúng tôi khảo sát lựa chọn bước sóng và tỉ lệ pha động phù hợp với thiết bị HPLC hiện có. Các kết quả chỉ ra rằng: Bước sóng tối ưu là 273nm, pha động tối ưu gồm methanol và nước tỉ lệ thể tích tương ứng 24:76, tốc độ pha động 1ml/phút, thời gian phân tích 6 phút cho mỗi mẫu và peak cafein chuẩn xuất hiện tại thời gian lưu xấp xỉ 4,5 phút.

3.2. Dựng đường chuẩn, tính LOD, LOQ

Kết quả đo lặp lại 3 lần mỗi mẫu chuẩn cho thấy, tại các giá trị nồng độ để xây dựng đường chuẩn, RSD đều nhỏ hơn 5%. Phương pháp có độ lặp lại tốt. Chọn giá trị nồng độ cafein 20 µg/ml ở khoảng giữa đường chuẩn, đo lặp lại 10 lần, thì nồng độ của dung dịch tính theo đường chuẩn cho kết quả có RSD = 0,8% và $t_{\text{thực nghiệm}} < t_{\text{lý thuyết}}$ do vậy đường chuẩn đạt độ tin cậy thống kê 95%.

Pha các dung dịch chuẩn cafein nồng độ tăng dần: 0,5 µg/ml; 5,0 µg/ml; 10,0 µg/ml; 20,0 µg/ml; 30 µg/ml; 40 µg/ml. Tiến hành phân tích các mẫu chuẩn trên hệ thống HPLC, đo diện tích peak của cafein. Đường chuẩn dựng được là sự phụ thuộc của diện tích peak (Y) và nồng độ (X) (hình 3.1). Đường chuẩn được vẽ bằng phần mềm excel và tính toán LOD, LOQ theo phương pháp 3σ (bảng 3.1).



Hình 3.1: Đường chuẩn cafein

Phương trình đường chuẩn thu được có dạng $y = 56,438.X - 1,506$. Khi xử lý thống kê số liệu đường chuẩn nhận thấy $b \neq 0$ là không có nghĩa nên chấp nhận $b=0$ ($P=95\%$), khi đó dạng đầy đủ của phương trình đường chuẩn là $Y = (56,385 \pm 0,099).X$.

Bảng 3.1: Số liệu thống kê của đường chuẩn

a	56,385	S_y	2,121
S_a	0,039	f	5,000

Bảng 3.2: Kết quả khảo sát hiệu suất thu hồi

Kí hiệu mẫu	Nồng độ cafein thêm chuẩn ban đầu ($\mu\text{g/ml}$)	Hệ số pha loãng	Khối lượng mẫu (gam)	Diện tích pic (mAu.s)	Nồng độ cafein tổng tính theo đường chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Hiệu suất thu hồi (H%)
M3-spike	0	2	0,2050	1300,947	46,145	
	15	2	0,2041	1711,463	60,706	97,1
	30	4	0,2011	1077,844	76,463	101,1
HV-1-spike	0	1	0,2004	ND	ND	
	15	1	0,2056	830,778	14,734	98,2
	30	1	0,2084	1680,837	29,810	99,4

*ND : Không phát hiện được

Kết quả chỉ ra hiệu suất thu hồi trung bình của phương pháp lớn hơn 90% nên kết luận phương pháp chiết tách cafein và định lượng

R^2	1,000	$\mathcal{E}_a = S_{a.t}$	0,099
t	2,571	$LOD = 3S_y/a$	0,113
		$LOQ = 10S_y/a$	0,376

Vậy dựa theo phương pháp 3σ , ta tính được:

Giới hạn phát hiện của phương pháp là:

$$LOD = 0,113 \mu\text{g/ml}.$$

Giới hạn định lượng của phương pháp là:

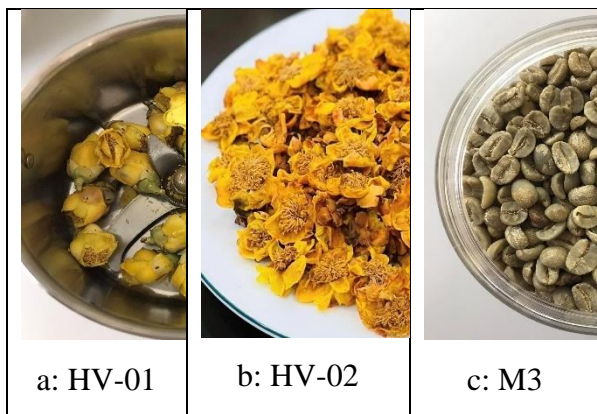
$$LOQ = 0,376 \mu\text{g/ml}.$$

3.3. Đánh giá độ thu hồi

Mẫu cà phê M3 được xử lý theo TCVN 9723:2013 và mẫu trà hoa vàng HV-1 được xử lý theo TCVN 9744:2013, tuy nhiên ở giai đoạn đầu tiên thêm cafein chuẩn gốc 1000 $\mu\text{g/ml}$ sao cho nồng độ cafein tương đối ở mức nồng độ thấp, trung bình và cao thuộc khoảng đường chuẩn. Số liệu được tổng hợp trong bảng 3.2.

bằng HPLC ứng dụng cho mẫu cà phê và trà hoa vàng có độ thu hồi tốt.

3.4. Phân tích mẫu thực



Hình 3.2: Hình ảnh một số mẫu phân tích

Bảng 3.3: Kết quả phân tích mẫu thực theo phương pháp đường chuẩn

Kí hiệu mẫu	Khối lượng mẫu (mg)	V dịch chiết (mL)	Hệ số pha loãng	Diện tích pic (mAu.s)	Nồng độ cafein trong mẫu dịch chiết (µg/ml)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng cafein trong mẫu thực (%)
HV-1	0,2004	50	1	ND	ND	5,53	ND
HV-2	0,2083	50	1	686,355	12,173	8,11	0,318
M1	0,2024	50	2	1211,748	42,981	6,32	1,133
M2	0,2033	50	2	1265,536	44,889	6,40	1,192
M3	0,2050	50	2	1300,947	46,145	6,88	1,209
M4	0,2017	50	2	1117,363	39,633	7,15	1,058
M5	0,2104	50	2	1383,957	49,089	10,76	1,307

Các mẫu thực sau khi chiết, pha loãng thích hợp bằng pha động và phân tích HPLC thì có 6/7 mẫu cho kết quả nồng độ cafein nằm trong khoảng đường chuẩn (bảng 3.3). 5 mẫu hạt cà phê đều có hàm lượng cafein trên 1%, hàm lượng cafein trung bình của 5 mẫu là 1,180%. Sử dụng chuẩn student so sánh thấy không có sự khác nhau có nghĩa giữa các giá trị hàm lượng này (độ tin cậy 95%) nên có thể kết luận các vùng trồng cà phê ở Mai Sơn cho chất lượng cà phê (về hàm lượng cafein) là tương đương nhau.

Các mẫu hạt cà phê nguyên chất (hình 3.2c), khô được xử lý theo TCVN 9723:2013 và mẫu trà hoa vàng (hình 3.2a,b) được xử lý theo TCVN 9744:2013. Các mẫu sau khi nghiền thành bột được đo hàm ẩm bằng máy đo chuyên dụng. Diện tích peak sắc ký lấy trung bình 3 lần đo lặp lại.

Tuy nhiên, khi phân tích HPLC dịch chiết mẫu HV-1 khi chưa pha loãng không thấy tín hiệu peak cafein rõ ràng (tín hiệu dưới giới hạn phát hiện) và khi cô đặc 10 lần bằng bay hơi nước (được dung dịch A) và phân tích theo phương pháp đường thêm chuẩn có xác định được hàm lượng cafein rất thấp 0,003% (bảng 3.4).

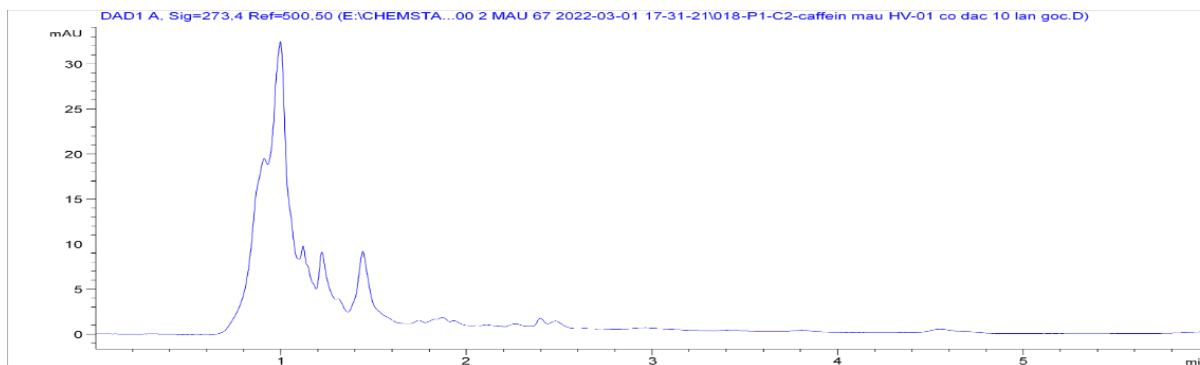
Ngoài ra, tín hiệu các tạp chất khác thu được từ sắc ký đồ mẫu HV-01 khi cô đặc 10 lần (hình 3.3) cũng thấp hơn nhiều so với HV-02 từ điều này có thể nghi ngờ mẫu trà hoa vàng HV-1 đã

bị chiết xuất được chất trước khi đưa ra thị trường và sản phẩm trà HV-01 không rõ nguồn gốc này ít có công dụng đối với sức khỏe. Để kiểm chứng nhận định trên vẫn cần thiết có

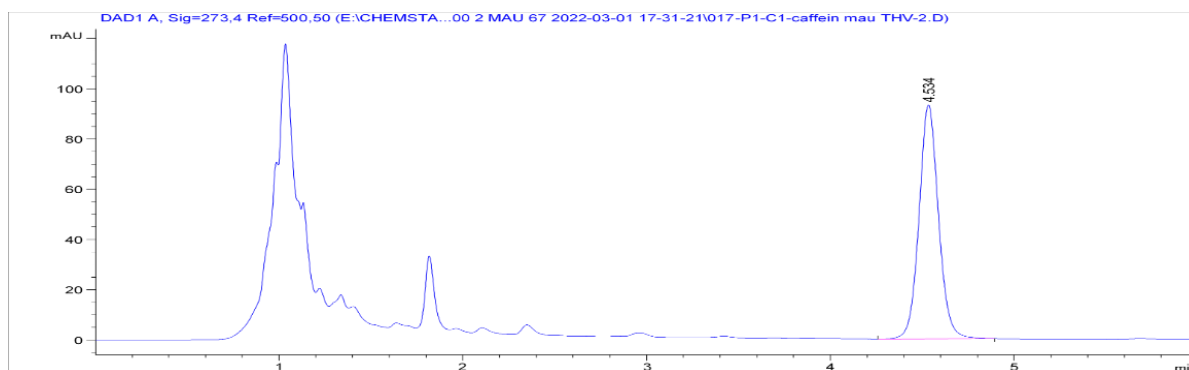
thêm các nghiên cứu rộng hơn về các catechin chính (EGC, EGCG, EC và ECG), hàm lượng các vitamin,...trong trà hoa vàng.

Bảng 3.4 : Kết quả phân tích phương pháp đường thêm chuẩn mẫu HV-01

STT	V dung dịch =10(ml)			Diện tích pic (mAu.s)	Phương trình đường thêm chuẩn	Nồng độ cafein trong dung dịch A (µg/ml)	Nồng độ cafein trong mẫu dịch chiết đầu (µg/ml)	Hàm lượng cafein trong mẫu thực (%)
	V dung dịch A (ml)	V dd chuẩn cafein 100 µg/ml (ml)	V pha động HPLC (ml)					
1	5	0,1	4,9	80,333	$y = 28,376 + 52,022. C$	1,090	0,109	0,003
2	5	0,2	4,8	130,526				
3	5	0,3	4,7	190,257				
4	5	0,4	4,6	230,584				
5	5	0,5	4,5	290,680				
6	5	0,6	4,4	340,326				



Hình 3.3 : Sắc ký đồ mẫu HV-01 khi cô đặc dịch chiết 10 lần



Hình 3.4: Sắc ký đồ mẫu HV-02

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ:

Đã định lượng được cafein trong 5 mẫu hạt cà phê khô đại diện trồng tại Mai Sơn, Sơn La. Hàm lượng cafein trung bình trong 5 mẫu là 1,18%, và xử lý thống kê số liệu cho thấy không có sự khác nhau về hàm lượng cafein trong các mẫu hạt cà phê khô trồng ở 5 xã khác nhau (với độ tin cậy 95%). Điều này cho thấy chất lượng hạt cà phê (về hàm lượng cafein) là tương đương nhau giữa các vùng.

Nghiên cứu cũng định lượng được cafein trong 02 mẫu trà hoa vàng trên thị trường trong đó mẫu HV-01 có hàm lượng 0,003%, mẫu HV-02 có hàm lượng 0,318%. Sự khác nhau rất lớn về hàm lượng cafein trong 2 mẫu này có thể do vùng trồng, do phương pháp sấy, bảo quản và do bên cung cấp.

Với kết quả trên, có thể thấy hàm lượng cafein trong trà hoa vàng rất thấp so với trong hạt cà phê. Nếu so sánh lượng tiêu thụ trong ngày của một người (1 cốc cà phê 10 gam với 1 cốc trà hoa vàng 3 gam) thì lượng cafein hấp thụ từ trà rõ ràng thấp hơn nhiều từ cà phê nguyên chất, đây là một cơ sở khoa học để gợi ý rằng sử dụng trà hoa vàng là một lựa chọn thay thế tốt và tự nhiên cho các sản phẩm cà phê và trà để hạn chế tác dụng phụ không mong muốn từ cafein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Fredholm, B.B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A. and Zvartau, E.E. (1999), Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews* 91, 83–133.
2. Fernando, C. D, & Soysa, P. (2016). *Simple isocratic method for simultaneous determination of caffeine and catechins in tea products by HPLC*, SpringerPlus, 5(1), 0–4. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2672-9>.
3. Ivanova, S., & Ivanov, K. (2020). *HPLC Method for Determination of Caffeine in Food Supplements for Weight Loss*, [Youth Science Forum Journal](#).
- [4] Phạm Cao Bach, Nguyễn Phi Hùng, Cam Thi Inh, Phạm Minh Quan, Trần Quốc Toàn, Phạm Thị Hồng Minh, Phạm Quốc Long, Nguyễn Thị Hồng Vân, 2020, *Determination of caffeine in the leaves and flowers of Camellia chrysantha by high-performance liquid chromatography with dad detection*, Vietnam Journal of Science and Technology, 58 (3) 267-273.

**A STUDY OF ASSESSING CAFFEINE CONTENT IN COFFEE (CATIMOR)
AND YELLOW TEA FLOWERS (*Camellia chrysantha*)**

Pham Thi Chuyen, Tran Hong Son, Le Sy Binh

Tay Bac University

Abstract: *This study aimed at assessing caffeine content in dried coffee Catimor coffee beans grown in Mai Son, Son La and yellow flower tea (*Camellia chrysantha*) currently on sale at local markets. HPLC was employed to make it possible to compare the caffeine content of dried coffee beans in different coffee growing areas in Mai Son district, and at the same time to compare the caffeine content between yellow tea flowers and coffee. This study provides some suggestions regarding the coffee content for beverage.*

Keywords: *Son La, coffee catimor, caffeine, *Camellia chrysantha**

Ngày nhận bài: 07/05/2022. Ngày nhận đăng: 25/05/2022.

Liên lạc: Phạm Thị Chuyên, e - mail: chuyenpt@utb.edu.vn