

TCVN 9745-1:2013

ISO 14502-1:2005

Xuất bản lần 1

**CHÈ – XÁC ĐỊNH CÁC CHẤT ĐẶC TRƯNG
CỦA CHÈ XANH VÀ CHÈ ĐEN –**

**PHẦN 1: HÀM LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG SỐ
TRONG CHÈ – PHƯƠNG PHÁP ĐO MÀU
DÙNG THUỐC THỬ FOLIN-CIOCALTEU**

*Determination of substances characteristic of green and black tea –
Part 1: content of total polyphenols in tea – Colorimetric method
using Folin-Ciocalteu reagent*

Lời nói đầu

TCVN 9745-1:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 14502-1:2005 và Đỉnh chính kỹ thuật 1:2006;

TCVN 9745-1:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F20 Chè và sản phẩm chè biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ TCVN 9745 (ISO 14502), Chè – Xác định các chất đặc trưng của chè xanh và chè đen gồm các phần sau đây:

TCVN 9745-1:2013 (ISO 14502-1:2005), Phần 1: Hàm lượng polyphenol tổng số trong chè – Phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu;

TCVN 9745-2:2013 (ISO 14502-2:2005), Phần 2: Hàm lượng catechin trong chè xanh – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Chè – Xác định các chất đặc trưng của chè xanh và chè đen –

Phần 1: Hàm lượng polyphenol tổng số trong chè – Phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu

Determination of substances characteristic of green and black tea – Part 1: Content of total polyphenols in tea – Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng polyphenol tổng số trong chè và chè hòa tan bằng phép phân tích đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu^[4]. Tiêu chuẩn này áp dụng cho cả sản phẩm chè xanh và chè đen.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

TCVN 9738 (ISO 1572), *Chè – Chuẩn bị mẫu nghiền và xác định hàm lượng chất khô*

TCVN 9741 (ISO 7513), *Chè hòa tan dạng rắn – Xác định độ ẩm (hao hụt khối lượng ở 103 °C)*

3 Nguyên tắc

Polyphenol từ phần mẫu thử của lá chè đã nghiền mịn được chiết bằng metanol 70 % ở 70 °C. Chè hòa tan được hòa trong nước nóng được bổ sung 10 % (thể tích) axetonitril để ổn định dịch chiết. Các

polyphenol trong dịch chiết được xác định bằng đo màu, dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu. Thuốc thử này chứa chất oxy hóa là axit phospho-vanframíc, trong quá trình khử, các nhóm hydroxy phenol dễ bị oxy hóa, chất oxy hóa này sinh ra màu xanh có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 765 nm. Phản ứng này là do sự hình thành màu xanh của vanfram và molybden. Các thuốc thử Folin-Ciocalteu phản ứng với nhiều hợp chất polyphenol và mặc dù có thể có đáp ứng khác nhau với các hợp chất đơn lẻ, thì việc lựa chọn axit gallic làm chất chuẩn hiệu chuẩn cũng giúp ích cho việc thu được dữ liệu polyphenol tổng số.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng phân tích, trừ khi có quy định khác.

4.1 Nước, phù hợp với loại 1 của TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987).

4.2 Axetonitril.

4.3 Metanol.

4.4 Hỗn hợp chiết metanol/nước, 70 % metanol (thể tích)

Cho 700 ml metanol (4.3) vào bình định mức một vạch 1 l. Pha loãng đến vạch bằng nước (4.1) và trộn.

4.5 Thuốc thử Folin-Ciocalteu, đã được pha chế có bán sẵn

Nên kiểm tra độ tuyến tính hiệu chuẩn bằng axit gallic để xác định sự phù hợp của thuốc thử được cung cấp.

4.6 Thuốc thử Folin-Ciocalteu loãng, 10 % (thể tích)

Dùng pipet chuyển 20 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu (4.5) vào bình định mức một vạch 200 ml. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

Chuẩn bị dung dịch thuốc thử trong ngày sử dụng.

Để tránh nhiễm bẩn thuốc thử Folin-Ciocalteu đậm đặc, loại bỏ thuốc thử đã chuẩn bị nhưng chưa sử dụng.

4.7 Dung dịch natri cacbonat, 7,5 % (khối lượng).

Cân ($37,50 \pm 0,01$) g natri cacbonat khan (Na_2CO_3) cho vào bình định mức một vạch 500 ml. Thêm nước ấm đủ đến nửa bình. Lắc để hòa tan natri cacbonat, để nguội đến nhiệt độ phòng, pha loãng bằng nước đến vạch và trộn.

CHÚ THÍCH Dung dịch này bền đến 1 tháng ở nhiệt độ phòng.

4.8 Dung dịch chuẩn gốc axit gallic, tương đương với axit gallic khan nồng độ khoảng 1 000 µg/ml.

Cân ($0,110 \pm 0,001$) g axit gallic ngâm một phần tử nước ($M = 188,14$) cho vào bình định mức một vạch 100 ml. Hòa tan trong nước, pha loãng đến vạch và trộn.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn mới trong ngày sử dụng.

CHÚ THÍCH Axit gallic ngâm một phần tử nước tốt hơn ở dạng khan, vì có độ hòa tan cao hơn, đã khử đặc tính hút ẩm và có sẵn loại đã được chứng nhận, ví dụ A.C.S, biểu thị cho các hóa chất đáp ứng các yêu cầu kỹ thuật của Hội hóa học Mỹ đưa ra. Nếu chưa biết độ ẩm thì cần xác định độ ẩm (hao hụt khối lượng ở 103°C) trên một phần mẫu chuẩn. Sau đó, có thể tính nồng độ của dung dịch chuẩn gốc theo axit gallic khan.

4.9 Dung dịch chuẩn axit gallic: từ A đến E

Dùng pipet chuyển các thể tích dung dịch chuẩn gốc axit gallic (4.8) trong Bảng 1 vào bình định mức một vạch 100 ml. Pha loãng đến vạch bằng nước và lắc. Chuẩn bị dung dịch chuẩn pha loãng này trong ngày sử dụng.

Bảng 1 – Dung dịch chuẩn axit gallic pha loãng

Dung dịch chuẩn axit gallic	Thể tích của dung dịch gốc axit gallic ml	Nồng độ danh định của chất chuẩn pha loãng $\mu\text{g/ml}$
A	1,0	10
B	2,0	20
C	3,0	30
D	4,0	40
E	5,0	50

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể các thiết bị, dụng cụ sau đây:

5.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến $\pm 0,001$ g.

5.2 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì được ở $70^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

5.3 Bộ phân phối, dùng cho hỗn hợp chiết metanol/nước (4.4), và cài đặt ở mức 5,0 ml.

5.4 Máy ly tâm, có lực ly tâm tương đối (R.C.F.) 2 000 (điển hình 3 500 r/min).

5.5 Máy đo quang phổ, cài đặt ở bước sóng 765 nm và có thể phù hợp với các cuvet có chiều dài đường quang 10 mm, tốt nhất là dùng cuvet dòng chảy tự động.

5.6 Pipet, thủy tinh hoặc tự động, có các dung tích bao trùm dài thể tích dùng cho chất chuẩn và các dịch pha loãng của dịch chiết mẫu.

5.7 Bình định mức một vạch, các dung tích 100 ml, 200 ml, 500 ml và 1 l.

5.8 Máy trộn Vortex, trộn hiệu quả trong quá trình chiết.

5.9 Ống chiết, bằng thủy tinh, dung tích 10 ml, được đậy kín và có thể chịu được khi ly tâm.

5.10 Ống chia độ, bằng thủy tinh, dung tích 10 ml, chia độ 0,1 ml.

Do phép phân tích nhạy với các tạp chất hữu cơ dạng vi lượng nên cần thực hiện quy trình làm sạch bổ sung đối với tất cả các ống chiết (5.9) và ống chia độ (5.10), rửa bằng axit nitric khoảng 15 % (thể tích), sau đó tráng kỹ bằng nước và làm khô trong tủ sấy ở 100 °C. Trong phép phân tích đo màu cuối cùng, nên sử dụng ống bằng chất dẻo dùng một lần thay cho việc dùng ống chia độ vì không cần phải làm sạch bổ sung.

6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo:

- TCVN 5609 (ISO 1839) đối với chè, và
- TCVN 9743 (ISO 7516) đối với chè hòa tan.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Để đảm bảo độ đồng nhất, nghiền mẫu chè theo TCVN 9738 (ISO 1572) và bảo quản các mẫu trong các vật chứa kín tránh ánh sáng.

Đối với chè hòa tan, chỉ yêu cầu nghiền đối với các mẫu có cấu trúc dạng hạt thô.

8 Cách tiến hành

8.1 Yêu cầu chung

Nếu có yêu cầu kiểm tra giới hạn lặp lại (10.2) thì tiến hành hai phép xác định đơn lẻ theo 8.2 đến 8.6 dưới các điều kiện lặp lại.

8.2 Xác định hàm lượng chất khô

Tính hàm lượng chất khô từ độ ẩm xác định được (hao hụt khối lượng ở 103 °C) trên phần mẫu thử (Điều 7) theo:

- TCVN 9738 (ISO 1572) đối với chè, hoặc
- TCVN 9741 (ISO 7513) đối với chè hòa tan.

8.3 Phần mẫu thử

8.3.1 Chè hòa tan

Cân $(0,500 \pm 0,001)$ g mẫu thử (Điều 7) cho vào bình định mức một vạch 50 ml.

8.3.2 Chè

Cân $(0,200 \pm 0,001)$ g mẫu thử (Điều 7) cho vào ống chiết (5.9).

8.4 Chiết các polyphenol

8.4.1 Chè hòa tan

8.4.1.1 Cho khoảng 25 ml nước nóng (nhiệt độ tối đa 60 °C) vào chè hòa tan đựng trong bình định mức (8.3.1). Trộn đều để hòa tan mẫu và để nguội đến nhiệt độ phòng.

8.4.1.2 Thêm 5,0 ml axetonitril (4.2). Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

8.4.2 Chè

8.4.2.1 Cho hỗn hợp chiết metanol/nước (4.4) đựng trong bộ phân phối (5.3) vào nồi cách thủy đặt ở 70 °C và để trong ít nhất 30 min để cho hỗn hợp chiết cân bằng.

8.4.2.2 Cho ống chiết chứa mẫu (8.3.2) vào nồi cách thủy đặt ở 70 °C. Phân phối 5,0 ml hỗn hợp chiết nóng metanol/nước từ 8.4.2.1 vào ống chiết, đậy nắp và trộn trên máy trộn vortex (5.8).

8.4.2.3 Tiếp tục đun nóng ống chiết 10 min trong nồi cách thủy, trộn trên máy trộn vortex sau 5 min đến 10 min.

Điều quan trọng là trộn đều kỹ các mẫu để đảm bảo chiết hết.

8.4.2.4 Lấy ống chiết ra khỏi nồi cách thủy và để nguội đến nhiệt độ phòng. Mở nắp và đặt ống vào máy ly tâm (5.4) ở tốc độ 3 500 r/min trong 10 min.

8.4.2.5 Gạn cẩn thận dịch nổi phía trên vào ống chia độ (5.10).

8.4.2.6 Lặp lại các bước chiết 8.4.2.2 đến 8.4.2.5. Phối trộn các dịch chiết, thêm hỗn hợp chiết nguội metanol/ nước (4.4) đến 10 ml và trộn.

8.4.2.7 Dịch chiết từ 8.4.2.6 có thể bền ít nhất trong 24 h nếu được bảo quản ở 4 °C. Để cho dịch chiết đạt đến nhiệt độ phòng trước khi tiến hành phép phân tích. Nếu chỉ một lượng nhỏ mẫu dạng hạt có thể bị lắng xuống trong quá trình bảo quản thì không cần phải tái huyền phù.

8.5 Dịch pha loãng

Dùng pipet chuyển 1,0 ml dịch chiết mẫu (dịch chiết chè hòa tan từ 8.4.1.2 hoặc dịch chiết chè từ 8.4.2.6) vào bình định mức một vạch 100 ml. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

8.6 Xác định

8.6.1 Dùng pipet thực hiện hai lần, mỗi lần chuyển 1,0 ml dung dịch chuẩn axit gallic A, B, C, D và E (4.9) vào các ống chất dẻo hoặc các ống chia độ (5.10) riêng rẽ.

CHÚ THÍCH Dung dịch này tương ứng với khoảng 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg và 50 µg axit gallic khan.

8.6.2 Dùng pipet thực hiện hai lần, mỗi lần chuyển 1,0 ml nước vào các ống chia độ (5.10). Đây là mẫu trắng thuốc thử.

8.6.3 Dùng pipet thực hiện hai lần, mỗi lần chuyển 1,0 ml dịch chiết mẫu pha loãng (8.5) vào các ống chia độ riêng rẽ.

8.6.4 Dùng pipet thêm 5,0 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu (4.6) vào từng ống và trộn.

8.6.5 Sau khi bổ sung thuốc thử Folin-Ciocalteu loãng trong vòng 3 min đến 8 min, dùng pipet lấy 4,0 ml dung dịch natri cacbonat (4.7) vào mỗi ống. Đậy nắp và trộn.

8.6.6 Để yên bình ở nhiệt độ phòng trong 60 min, sau đó đo mật độ quang trong cuvet có chiều dài đường quang 10 mm so với nước trên máy đo quang phổ (5.5) đặt ở bước sóng 765 nm.

8.6.7 Mẫu trắng thuốc thử (8.6.2) phải có mật độ quang < 0,010. Các giá trị mẫu trắng cao hơn cho thấy có sự nhiễm từ nước, thuốc thử hoặc dụng cụ thủy tinh. Điều quan trọng nữa là mật độ quang của mẫu phải nằm trong dải hiệu chuẩn. Nếu mật độ quang của mẫu cao hơn mật độ quang của 50 µg dung dịch chuẩn axit gallic E thì lặp lại phép phân tích đo màu bằng cách tăng độ pha loãng (8.5).

9 Tính kết quả

9.1 Tính khối lượng của axit gallic khan, m , trong 1,0 ml dịch lỏng của dung dịch chuẩn A, B, C, D và E (4.9) từ 8.6.1, chính xác đến 0,1 µg, dùng công thức:

$$m = \frac{m_0 \times V \times w_{DM, \text{chuẩn}} \times 10000}{100 \times 100}$$

Trong đó

m_0 là khối lượng của axit gallic ngậm một phân tử nước, được dùng để chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc (4.8), tính bằng gam (g);

V là thể tích của dung dịch chuẩn gốc axit gallic, được dùng để chuẩn bị các dung dịch chuẩn A, B, C, D và E (4.9), tính bằng mililit (ml);

$w_{DM, chuẩn}$ là hàm lượng chất khô của axit gallic, tính bằng phần trăm khối lượng (%).

9.2 Dựng đường chuẩn tuyến tính phù hợp nhất từ khối lượng của axit gallic khan trong các chất chuẩn A, B, C, D và E (4.9), như đã tính trong 9.1, dựa vào mật độ quang của dung dịch chuẩn axit gallic sau khi trừ đi mật độ quang của mẫu trắng thuốc thử.

Thu lấy giá trị độ dốc của đường chuẩn và giá trị giao điểm. Đường chuẩn axit gallic điển hình được nêu trong Phụ lục A.

Phải thu được hiệu chuẩn tuyến tính. Tính giá trị độ dốc của đường chuẩn, chính xác đến 0,000 1 để dùng cho các phép tính tiếp theo. Hiệu chuẩn tuyến tính cũng phải có giá trị giao điểm gần với giá trị ban đầu. Các giá trị giao điểm trên mật độ quang của trục $y > \pm 0,04$ phải được kiểm tra đánh giá. Ví dụ, kiểm tra độ ẩm của axit gallic, việc chuẩn bị chất chuẩn hoặc hiệu chuẩn pipet.

Hàm lượng polyphenol tổng số, w_T , tính bằng phần trăm khối lượng mẫu khô, được tính bằng công thức:

$$w_T = \frac{(D_{mẫu} - D_{giao\ điểm}) \times V_{mẫu} \times d \times 100}{S_{chuẩn} \times m_{mẫu} \times 10\ 000 \times w_{DM, mẫu}}$$

Trong đó

$D_{mẫu}$ là mật độ quang thu được đối với dung dịch mẫu thử;

$D_{giao\ điểm}$ là mật độ quang tại điểm đường chuẩn tuyến tính phù hợp nhất cắt với trục y ;

$S_{chuẩn}$ là độ dốc thu được từ hiệu chuẩn tuyến tính phù hợp nhất;

$m_{mẫu}$ là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

$V_{mẫu}$ là thể tích của dịch chiết mẫu (50 ml đối với chè hòa tan và 10 ml đối với chè), tính bằng mililit (ml);

d là hệ số pha loãng được dùng trước khi xác định phép đo màu (điển hình từ 1,0 ml đến 100 ml, vì vậy hệ số pha loãng là 100);

$w_{DM, mẫu}$ là hàm lượng chất khô của mẫu thử, xác định được theo 8.2, tính bằng phần trăm khối lượng (%).

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm để xác định độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục B. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và các chất nền khác với các giá trị đã nêu.

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, đơn lẻ thu được, khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên cùng vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % trường hợp vượt quá giá trị giới hạn lặp lại, r , nêu trong Bảng B.1.

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai kết quả thử đơn lẻ thu được, khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên cùng vật liệu thử giống hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % trường hợp vượt quá giá trị giới hạn tái lập, R , nêu trong Bảng B.1.

11 Báo cáo thử nghiệm

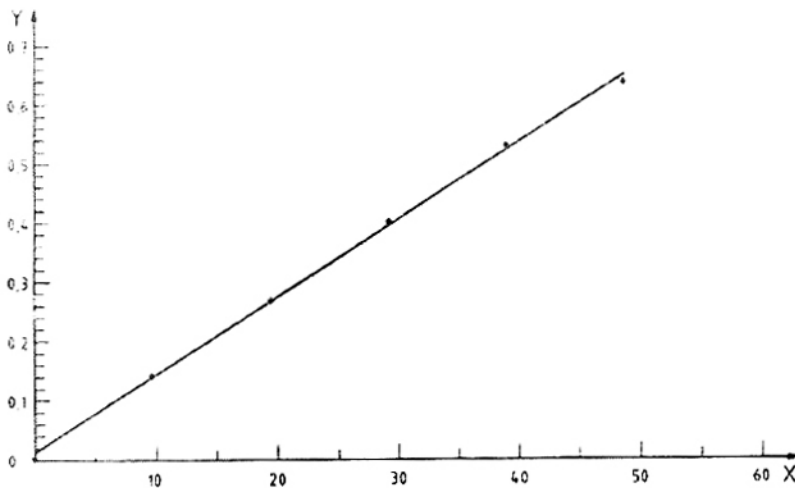
Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng (nếu biết);
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết thao tác khác với quy định trong tiêu chuẩn này hoặc tùy chọn cũng như các sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Đường chuẩn của axit gallic



X Hàm lượng của axit gallic khan, tính bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$)

Y Mật độ quang, 765 nm

$$y = 0,132x + 0,0113$$

$$R^2 = 0,998\ 5$$

Giá trị độ dốc của đường chuẩn = 0.013 2

Giá trị giao điểm = 0.011 3

Hình A.1 – Đường chuẩn tuyến tính phù hợp nhất đối với axit gallic

Phụ lục B

(tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử liên phòng thử nghiệm được thực hiện vào năm 2001, dưới sự bảo trợ của Tổ chức tiêu chuẩn hóa quốc tế, cho các kết quả thống kê [được đánh giá theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)] nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Dữ liệu về độ chụm

Nhận biết mẫu	Chè xanh A	Chè đen B	Chè đen C
Số lượng các phòng thử nghiệm tham gia	23	23	23
Số lượng các kết quả thử nghiệm được chấp nhận	20	20	20
Hàm lượng polyphenol tổng số trung bình, tính theo hàm lượng chất khô, %	24,35	18,81	13,95
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,332	0,218	0,214
Hệ số biến thiên lặp lại, %	1,36	1,16	1,53
Giới hạn lặp lại, $r(=2,8 s_r)$	0,93	0,61	0,60
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	1,129	1,186	1,029
Hệ số biến thiên tái lập, %	4,64	6,31	7,38
Giới hạn tái lập, $R(=2,8 s_R)$	3,16	3,32	2,88

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 5609:2007 (ISO 1839:1980), *Chè – Lấy mẫu*
 - [2] TCVN 9743:2013 (ISO 7516:1984), *Chè hòa tan dạng rắn – Lấy mẫu*
 - [3] TCVN 6910-2:2010 (ISO 5725-2:1994), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn*
 - [4] SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R. and LAMUELA-RAVENTOS, R.M. *Analysis of total phenolics and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. In: *Methods in Enzymology. Oxidants and Antioxidants*, Part A, Lester Packer, ed. (1999) **299**, pp. 152-178
-