

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.300 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 1/6
---	----------------------------------	--

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG SỐ TRONG CHÈ, RAU CỦ QUẢ VÀ SẢN PHẨM CỦA NÓ BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO MÀU DÙNG THUỐC THỬ FOLIN-CIOCALTEU

Determination of total polyphenol in tea, fruits, vegetables and products – colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Phạm Thị Kim Cúc	Trần Thái Vũ	Trịnh Thị Minh Nguyệt

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1			
2			

A. TỔNG QUAN

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.300 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 2/6</p>
--	--	--

I. Phạm vi áp dụng.

- Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng polyphenol tổng số trong chè và chè hòa tan, rau củ quả và sản phẩm của nó bằng phép phân tích đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu.

II. Tài liệu tham khảo.

- Phương pháp này dựa trên : TCVN 9745-1:2013

III. Nguyên tắc.

- Polyphenol từ phần mẫu thử của lá chè đã nghiền mịn được chiết bằng methanol 70% ở 70°C. Chè hòa tan được hòa trong nước nóng được bổ sung 10% (thể tích) aceton 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 oxi hóa là acid phosphor-vonframic, trong quá trình khử, các nhóm hydroxyl phenol dễ bị oxi hóa, chất oxi hóa này sinh ra màu xanh có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 765nm. Phản ứng này là do sự hình thành màu xanh của vonfarm 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 galic làm chất chuẩn hiệu chuẩn cũng giúp ích cho việc thu được dữ liệu polyphenol tổng số.

VI. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.

- Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi cần thiết.
- Các hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.

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

- Cân phân tích
- Nồi cách thủy
- Máy ly tâm
- Ống ly tâm
- Máy đo quang
- Pipet các loại
- Bình định mức các loại
- Máy vortex

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hoá chất.

Chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng phân tích.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.300 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 3/6
---	----------------------------------	--

- Nước cất
- Acetonitril
- Methanol
- Hỗn hợp chiết methanol/nước, 70% methanol: cho 700ml methanol vào bình định mức một vạch 1L. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.
- Thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%: hút 10ml thuốc thử Folin-Ciocalteu vào bình định mức 100mL bằng nước và trộn.
Dung dịch này chuẩn bị trong ngày sử dụng.
- Dung dịch Na_2CO_3 7.5%: cân 37.5g Na_2CO_3 cho vào bình định mức một vạch 500ml, thêm nước ấm đủ đến nửa bình. Lắc để hòa tan Na_2CO_3 , để nguội đến nhiệt độ phòng, pha loãng bằng nước đến vạch và trộn.

2. Chất chuẩn..

- Chất chuẩn: Axit gallic.
- Dung dịch chuẩn gốc khoảng 1000ppm: Cân khoảng 0.11g (m) axit gallic ngâm một phân tử nước cho vào bình định mức 100ml. hòa tan trong nước và pha loãng tới vạch và trộn. Nồng độ chính xác của dung dịch chuẩn được tính theo công thức sau:

$$C \text{ (ppm)} = m \cdot 170.12 / 188.14 / 100 \cdot 1000 \cdot 1000 \cdot \text{độ tinh khiết}$$

Chuẩn bị dung dịch chuẩn mới trong ngày sử dụng.

- Dãy chuẩn làm việc: Pha dung dịch chuẩn làm việc theo bảng sau:

Dung dịch chuẩn axit gallic	Thể tích dung dịch chuẩn gốc axit gallic, ml	Thể tích định mức, ml	Nồng độ chuẩn làm việc, ppm
A	1.0	100	10
B	2.0	100	20
C	3.0	100	30
D	4.0	100	40
E	5.0	100	50

Dãy chuẩn này được chuẩn bị trong ngày sử dụng.

III. Kiểm soát QA/QC.

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích.

- Mẫu Blank hóa chất
- Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu

Thực hiện mẫu Blank, mẫu QC theo mục VI.2.

VI. Phân tích mẫu.

1. Chuẩn bị mẫu.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.300 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 4/6</p>
--	--	--

Nghiên mìn và đồng nhất mẫu, bảo quản các mẫu trong các vật chứa kín tránh ánh sáng.

2. Xác định hàm lượng chất khô

Tinh hàm lượng chất khô từ độ ẩm xác định (hao hụt khối lượng ở 103⁰C) trên phần mẫu thử theo tiêu chuẩn quy định cho từng nền mẫu khác nhau.

3. Chiết mẫu.

a. *Đối với chè hòa tan và sản phẩm từ chè:*

- Cân 0.5g mẫu (nếu mẫu có hàm lượng nước lớn thì cân khối lượng mẫu sao cho khối lượng quy về khô là khoảng 0.5g) cho vào bình định mức 50ml. Cho khoảng 25ml nước nóng (nhiệt độ tối đa khoảng 60⁰C) vào chè hòa tan đựng trong bình định mức. Trộn đều để hòa tan mẫu và để nguội đến nhiệt độ phòng.

Thêm 5.0ml acetonitrile, pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

b. *Đối với chè, rau củ quả:*

- Cân 0.2g (nếu mẫu có hàm lượng nước lớn thì cân một lượng mẫu sao cho khối lượng quy về khô là khoảng 0.2g) cho vào ống ly tâm
- Cho hỗn hợp chiết methanol/nước vào nồi cách thủy ở 70⁰C và để ít nhất 30 phút để cho hỗn hợp chiết cân bằng.
- Cho ống ly tâm chứa mẫu vào nồi cách thủy đặt ở 70⁰C. Thêm 5.0ml hỗn hợp chiết nóng ở trên , đậy nắp, trộn bằng máy vortex.
- Tiếp tục đun nóng 10 phút trong nồi cách thủy, trộn trên máy vortex sau 5 phút đến 10 phút (trộn kỹ để đảm bảo chiết hết).
- Lấy ống chiết ra khỏi nồi cách thủy, để nguội về nhiệt độ phòng. Ly tâm trong 10 phút ở 3500r/min.
- Gạn dung dịch ở phía trên vào bình định mức 10ml
- Chiết lần hai và gộp dịch chiết vào bình định mức 10ml, thêm hỗn hợp chiết nguội methanol/nước đến vạch và trộn.
- Dung dịch này bền ít nhất 24h nếu được bảo quản ở 4⁰C.

4. Pha loãng mẫu:

- Hút 1.0ml dịch chiết mẫu vào bình định mức 100ml. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

5. Lên màu:

- Dùng pipet hút 2.0ml dung dịch chuẩn axit gallic A, B, C, D, E vào ống ly tâm 50ml
- Hút 2.0ml nước cất vào ống ly tâm 50ml để làm mẫu blank
- Hút 2.0ml dịch chiết mẫu pha loãng vào ống ly tâm 50ml
- Thêm 5.0ml thuốc thử Folin-Ciocalteu vào từng ống và trộn
- Sau khi thêm thuốc thử 3-8 phút, thêm 4.0ml dung dịch Na₂CO₃ vào mỗi ống. Đậy nắp và trộn.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.300 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 5/6</p>
--	--	--

- Để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 phút, sau đó đo mật độ quang trong cuvet 10mm ở bước sóng 765nm.
- Mẫu trắng thuốc thử phải có mật độ quang <0.010. Nếu cao hơn thì có nghĩa đã bị nhiễm bẩn từ nước, thuốc thử hoặc dụng cụ.

6. Đo quang:

Sau khi cho tác nhân khử vào, mẫu Blank. Đường chuẩn và mẫu được đo màu trên thiết bị UV – Vis trong khoảng thời gian 10 – 30 phút.

- Đo quang ở bước sóng 765nm.
- Sử dụng Blank nước cất có thêm thuốc thử để cell blank (hoặc Auto Zero).
- Trình tự đo màu:
 - ✓ Các điểm chuẩn từ thấp đến cao
 - ✓ Mẫu blank
 - ✓ Mẫu, mẫu lặp
 - ✓ Chuẩn check.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

Hàm lượng polyphenol trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$C_{ppm} = \frac{C_0 * f * V_{dm}}{m}$$

Trong đó:

C₀: nồng độ được suy ra từ đường chuẩn, ppm

f: hệ số pha loãng

V_{dm}: thể tích định mức, ml

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Đồ thị tuyến tính tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với r² ≥ 0.995
- ✓ Độ lệch của dung dịch chuẩn check không quá 15%
- ✓ Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả phân tích không quá 5% các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại (r) và tái lặp (R) được nêu trong bảng 1

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

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
CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ		HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH		Mã số: HD-TN.000 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 6/6

- E. **BÁO CÁO KẾT QUẢ.**
- ✓

Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu:

 - BM.15.04a
 - BM.15.06