

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13283:2021

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CHLOROPHYLL
TỔNG SỐ BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ**

Foodstuff – Determination of total chlorophyll content by spectrophotometric method

HÀ NỘI – 2021

Lời nói đầu

TCVN 13283:2021 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 942.04, *Chlorophyll in plants. Spectrophotometric method for total and the A and B components*;

TCVN 13283:2021 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm – Xác định hàm lượng chlorophyll tổng số bằng phương pháp quang phổ

Foodstuff – Determination of total chlorophyll content by spectrophotometric method

CẢNH BÁO: Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp quang phổ để xác định hàm lượng chlorophyll tổng số và các thành phần chlorophyll A, B trong thực vật.

2 Nguyên tắc

Các chất cần phân tích được chiết khỏi nền mẫu bằng axeton 85 % và được tinh sạch. Đo độ hấp thụ của dịch chiết ở bước sóng 660 nm và 642,5 nm và xác định hàm lượng các chất.

3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, sử dụng nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Axeton

3.2 Dung dịch axeton trong nước 85 % (phần thể tích)

3.3 Ete khan, loại thương mại, không cần làm sạch thêm

3.4 Natri phosphat (Na_3PO_4), khan

3.5 Canxi cacbonat (CaCO_3), khan

3.6 Natri sulfat (Na_2SO_4), khan

4 Thiết bị, dụng cụ

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

- 4.1 Cối và chày**, cối thủy tinh có đường kính trong khoảng 10 cm với miệng cối nhẵn.
- 4.2 Chai rửa**, loại có gắn quả bóp cao su, có thể sử dụng bằng tay.
- 4.3 Bộ trộn tốc độ cao**.
- 4.4 Bình định mức**, dung tích 100 ml.
- 4.5 Cuvet thạch anh**, có nắp đậy bằng thủy tinh.
- 4.6 Máy đo quang phổ**, có thể đo được ở bước sóng 660 nm và bước sóng 642,5 nm với bức xạ nhiễu không đáng kể, sử dụng ống cuvet có nắp thủy tinh kín khí khi làm việc với ete.
- 4.7 Cân**, có thể cân chính xác đến 0,1 g.
- 4.8 Phễu chiết Buchner**.
- 4.9 Pipet**.
- 4.10 Ống dẫn**, đường kính 20 mm
- 4.11 Bình phản ứng**, dung tích 60 mL

5 Lấy mẫu

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Tham khảo các tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm. Trong trường hợp chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm, việc lấy mẫu theo thỏa thuận giữa các bên liên quan.

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

6 Cách tiến hành

6.1 Yêu cầu chung

Các dụng cụ thủy tinh phải được rửa bằng dung dịch natri phosphat đặc để loại bỏ vết axit có thể làm phân hủy chlorophyll.

6.2 Chuẩn bị mẫu thử

Cắt nhỏ phần mẫu thử rồi trộn kỹ.

6.3 Chiết chlorophyll từ mô

Dùng cân (4.7), cân từ 2 g đến 10 g mẫu của mô thực vật tươi (tùy thuộc vào hàm lượng chlorophyll) cho vào cốc trộn của bộ trộn (4.3) có chứa khoảng 0,1 g canxi cacbonat (3.5) hoặc sử dụng chày và cối (4.1). Sau đó thêm dung dịch axeton 85 % (3.2) và nghiền tiếp cho đến khi mô được nghiền nhỏ hoàn toàn. Lọc hỗn hợp qua phễu (4.8) có gắn giấy lọc định lượng. Rửa phần còn lại bằng dung dịch axeton 85 % (3.2), nếu cần, sử dụng một lượng nhỏ ete (3.3) để lấy hết các vết chất màu còn lại. Thu lấy dịch lọc vào bình thủy tinh. Nếu chiết chưa hết, cho lại phần còn lại và giấy lọc vào cốc trộn có chứa nhiều dung dịch axeton 85 % hơn và chiết lại. Lọc, rửa như trên và thu lấy dịch lọc vào bình chứa dịch lọc trước đó.

Chuyển dịch lọc vào bình định mức 100 ml (4.4) và thêm dung dịch axeton 85 % (3.2) đến vạch.

Dùng pipet (4.9) lấy 25 ml đến 50 ml dịch chiết cho vào phễu chiết có chứa khoảng 50 ml ete (3.3). Thêm nước từ từ cho đến khi tất cả chất màu tan trong dầu chuyển hết sang lớp ete. Để phân lớp và loại bỏ lớp nước.

Đặt phễu chiết có chứa lớp ete vào giá đỡ phía trên. Thêm khoảng 100 ml nước vào phễu chiết thứ hai được đặt ở dưới phễu chiết thứ nhất. Đặt ống dẫn (4.10) vào phễu chiết thứ nhất và để lớp ete chảy qua ống xuống đáy của phễu chiết thứ hai. Khi tất cả dung dịch chảy hết khỏi phễu chiết thứ nhất, tráng phễu và ống dẫn bằng cách cho nhỏ giọt một lượng nhỏ ete (3.3). Đặt ống dẫn vào phễu chiết thứ nhất và đổi chỗ cho phễu chiết thứ hai đang chứa lớp ete. Để phân lớp và loại bỏ lớp nước ở phễu chiết thứ nhất, thêm một lượng nước vào phễu chiết thứ hai và lặp lại quá trình rửa. Tiếp tục rửa lớp ete cho đến khi axeton được loại bỏ hết (từ 5 lần đến 10 lần rửa). Sau đó chuyển lớp ete vào bình định mức 100 ml (4.4), pha loãng bằng ete đến vạch và trộn đều.

6.4 Đo quang phổ

Thêm 1 muỗng natri sulfat khan (3.6) (1 muỗng tương đương 5 g hoặc 5 ml) vào bình phản ứng dung tích 60 ml (4.11) và cho dung dịch ete có chứa chất màu thu được trong (6.3) vào bình. Khi dung dịch trong, cho phần dịch trong vào một bình khô khác và pha loãng vừa đủ bằng ete khan (3.3) để thu được độ hấp thụ A trong khoảng từ 0,2 đến 0,8 ở bước sóng được sử dụng.

CHÚ THÍCH: Độ hấp thụ thích hợp nhất là khoảng 0,6 đo được ở bước sóng 660 nm, khi đó độ hấp thụ của dung dịch này sẽ thích hợp khi đo ở bước sóng 642,5 nm.

Rót đầy ete vào hai cuvet sạch và lau xung quanh bề mặt cuvet bằng bông ướt tẩm cồn, sau đó bằng bông khô. Đặt cuvet vào máy đo quang phổ (4.6), tiến hành hiệu chuẩn máy trước mỗi lô mẫu phân tích. Xác định độ hấp thụ quang của mỗi dung dịch mẫu thử ở bước sóng 660 nm và 642,5 nm.

7 Tính kết quả

Nồng độ chlorophyll tổng số, C , và nồng độ các thành phần chlorophyll A (C_A), B (C_B), biểu thị bằng miligam trên lít, tính theo Công thức (1), (2), (3):

$$C = 7,12 \times A_{660,0} + 16,8 \times A_{642,5} \quad (1)$$

$$C_A = 9,93 \times A_{660,0} - 0,777 \times A_{642,5} \quad (2)$$

$$C_B = 17,6 \times A_{642,5} - 2,81 \times A_{660,0} \quad (3)$$

Hàm lượng chlorophyll tổng số và hàm lượng các thành phần chlorophyll A, B, X_i , biểu thị bằng miligam trên gam (mg/g), được tính theo Công thức (4):

$$X_i = \frac{C_i \times V \times k}{m \times 1000} \quad (4)$$

Trong đó:

C_i là nồng độ của chlorophyll (C , C_A hoặc C_B) được tính theo Công thức (1), (2) hoặc (3);

V là thể tích định mức, tính bằng mililit (ở đây $V = 100$ mL);

k là hệ số pha loãng;

m là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

1000 là hệ số quy đổi từ lít thành mililit.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được.