

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9744:2013**

**ISO 10727:2002**

Xuất bản lần 1

**CHÈ VÀ CHÈ HÒA TAN DẠNG RẮN –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CAFEIN –  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**  
*Tea and instant tea in solid form – Determination of caffeine content –  
Method using high-performance liquid chromatography*

HÀ NỘI - 2013

**Lời nói đầu**

TCVN 9744:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 10727:2002;

TCVN 9744:2013 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.

## Chè và chè hòa tan dạng rắn - Xác định hàm lượng cafein - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

*Tea and instant tea in solid form - Determination of caffeine - content -  
Method using high-performance liquid chromatography*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định hàm lượng cafein của chè và chè hòa tan. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho chè xanh, chè đen và các sản phẩm chè đã tách cafein.

### 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 9738:2013 (ISO 1572:1980), *Chè – Chuẩn bị mẫu nghiên cứu và xác định hàm lượng chất khô.*

TCVN 9741:2013 (ISO 7513:1990), *Chè hòa tan dạng rắn – Xác định độ ẩm (hao hụt khối lượng ở 103 °C).*

### 3 Nguyên tắc

Cafein từ phần mẫu thử được chiết bằng cách cho hồi lưu với nước có magie oxit. Sau khi lọc, hàm lượng cafein được định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao có detector UV.

### 4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích, trừ khi có qui định khác.

## **TCVN 9744:2013**

**4.1 Nước, phù hợp loại 1** qui định trong TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987).

**4.2 Metanol, loại HPLC.**

**4.3 Pha động, hỗn hợp metanol/nước**

Cho 600 ml metanol (4.2) vào bình định mức một vạch 2 lít. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn. Lọc hỗn hợp qua bộ lọc cỡ lỗ 0,45  $\mu\text{m}$  (5.3).

Bằng cách chỉnh nồng độ metanol, có thể cải tiến thời gian lưu của cafein để tối ưu việc tách của HPLC. Cũng có thể cải tiến thời gian lưu bằng cách tăng nhiệt độ cột, nhưng không được quá 60 °C.

**4.4 Hỗn hợp etanol/nước, 1/4 (phần thể tích).**

**4.5 Magie oxit (còn được gọi "magie oxit nặng").**

CHÚ THÍCH Magie oxit nhẹ có thể cho giá trị hàm lượng cafein không chính xác.

**4.6 Dung dịch chuẩn gốc cafein, tương ứng với 500  $\mu\text{g/ml}$**

Cân 0,125 g cafein, chính xác đến 0,001 g, cho vào bình định mức một vạch 250 ml. Thêm hỗn hợp etanol/nước (4.4) đủ đến nửa bình. Lắc để hòa tan cafein rồi pha loãng đến vạch bằng hỗn hợp etanol/nước.

Dung dịch này bền đến 1 tháng nếu được bảo quản trong tủ lạnh.

**4.7 Các dung dịch chuẩn cafein**

Các dung dịch chuẩn A,B,C và D phải được chuẩn bị trong ngày sử dụng.

**4.7.1 Dung dịch chuẩn cafein A, tương ứng với 15  $\mu\text{g/ml}$**

Đưa nhiệt độ của dung dịch chuẩn gốc cafein (4.6) đến nhiệt độ phòng. Dùng pipet chuyên 3,0 ml dung dịch này vào bình định mức một vạch 100 ml. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

**4.7.2 Dung dịch chuẩn cafein B, tương ứng với 10  $\mu\text{g/ml}$**

Tiến hành theo qui trình nêu trong 4.7.1 nhưng dùng pipet lấy 2,0 ml dung dịch chuẩn gốc (4.6).

**4.7.3 Dung dịch chuẩn cafein C, tương ứng với 5  $\mu\text{g/ml}$**

Tiến hành theo qui trình nêu trong 4.7.1 nhưng dùng pipet lấy 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc (4.6).

**4.7.4 Dung dịch chuẩn cafein D, tương ứng với 2  $\mu\text{g/ml}$**

Dùng pipet chuyển 20-ml dung dịch chuẩn B (4.7.2) vào bình định mức một vạch 100 ml. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

## 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 Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao**, được trang bị detector UV, cho phép đo ở bước sóng từ 254 nm đến 280 nm và có hệ thống thu nhận/tích phân dữ liệu hoặc bộ ghi biểu đồ.

CHÚ THÍCH Bước sóng gần 280 nm là tốt nhất vì bước sóng hấp thụ UV của cafein tối đa ở 272 nm.

Vì nhiệt độ hằng ngày dao động lớn, nên phải có biện pháp để đảm bảo nhiệt độ cột không đổi, ví dụ sử dụng lò cột hoặc túi nước.

**5.2 Cột sắc ký dùng cho HPLC**, loại pha đảo C18, tốt nhất có các hạt hình cầu và hiệu quả ở ít nhất 5 000 đĩa lý thuyết<sup>1)</sup>. Từ diện tích pic thu được bằng cách bơm một trong số các dung dịch chuẩn cafein (4.7), số lượng đĩa theo lý thuyết  $N$  của cột có thể được tính như sau:

$$N = 5,54 \left( \frac{t}{W_{0,5}} \right)^2$$

Trong đó

$t$  là thời gian lưu của pic;

$W_{0,5}$  là chiều rộng pic tại nửa chiều cao pic.

CHÚ THÍCH Trong tiêu chuẩn này, các điều kiện về sắc ký và thành phần của pha động (4.3) được qui định là thích hợp đối với cột C18 Partisphere kích thước 110 mm × 4,6 mm, phù hợp với hệ thống HPLC của hãng Whatman. Nếu sử dụng các loại cột khác, thì có thể cần phải thay đổi pha động và các điều kiện sắc ký.

**5.3 Dụng cụ lọc**, bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 μm.

**5.4 Bếp điện**, phù hợp với bình cầu đáy tròn dung tích 1 lít.

**5.5 Bình cầu**, đáy tròn dung tích 1 lít, có cổ thủy tinh mài.

**5.6 Hạt chống trào**.

**5.7 Ống sinh hàn**, được làm lạnh bằng nước, có khớp thủy tinh mài gắn với bình cầu đáy tròn dung tích 1 lít.

<sup>1)</sup> Spherisob 5 ODS, Spherisob 10 ODS, Nucleosil 5 C18, Nucleosil 7 C18, Nucleosil 10 C18, Zorbax BP C18, Hypersil ODS, CP-Sper C18, Bondapak C18, Supelcosil C18 và Partisphere C18 là các ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

## **TCVN 9744:2013**

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

## **6 Lấy mẫu**

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm nhận đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình bảo quản hoặc vận chuyển.

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

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

## **7 Chuẩn bị mẫu thử**

Nghiền mẫu chè xanh hoặc chè đen theo TCVN 9738 (ISO 1572).

Không cần nghiền đối với mẫu chè hòa tan.

## **8 Cách tiến hành**

### **8.1 Yêu cầu chung**

Nếu đáp ứng yêu cầu độ lặp lại, thì tiến hành hai lần xác định đơn lẻ theo 8.2 đến 8.6 trong các điều kiện lặp lại.

### **8.2 Xác định hàm lượng chất khô**

Tinh hàm lượng chất khô từ phương pháp xác định độ ẩm (hao hụt khối lượng ở 103 °C) đã được xác định trên phần mẫu thử theo:

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

### **8.3 Phần mẫu thử**

#### **8.3.1 Chè xanh và chè đen**

Cân 1,0 g mẫu thử (Điều 7), chính xác đến 0,001 g, cho vào bình cầu đáy tròn (5.5)

#### **8.3.2 Chè hòa tan**

Cân 0,5 g mẫu thử (Điều 7), chính xác đến 0,001 g, cho vào bình cầu đáy tròn (5.5).

## 8.4 Chiết cafein

8.4.1 Cho  $4,5 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$  magie oxit (4.5) vào ché đựng trong bình cầu, thêm vài hạt chống trào (5.6) và 300 ml nước. Cân bình và lượng chứa bên trong, chính xác đến 0,1 g.

8.4.2 Trộn lượng chứa bên trong bình. Gắn ống sinh hàn (5.7), đặt bình cầu lên bếp điện (5.4) và đun nhanh đến sôi. Giảm nhiệt độ và cho sôi nhẹ trong 20 min, thỉnh thoảng xoay bình.

8.4.3 Lấy bình chứa mẫu ra khỏi bếp điện và để nguội đến nhiệt độ phòng. Làm khô phía bên ngoài bình rồi cân chính xác đến 0,1 g. Khối lượng của bình đã nguội và lượng chứa bên trong phải bằng khối lượng xác định được trong 8.4.1. Nếu có chênh lệch khối lượng, thì thêm đủ nước để tăng đến khối lượng xác định được trong 8.4.1 rồi trộn đều lượng mẫu này.

8.4.4 Lấy bình ra, để yên cho lượng chứa trong bình lắng xuống lấy khoảng 10 ml dịch nổi phía trên rồi lọc qua bộ lọc (5.3).

## 8.5 Dịch pha loãng (chỉ đối với chè xanh, chè đen và chè hòa tan thông thường)

Dùng pipet chuyển 1,0 ml dịch lọc thu được trong 8.4.4 vào bình định mức một vạch 10 ml. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

Đối với các sản phẩm đã tách cafein, thì không cần pha loãng.

## 8.6 Xác định

### 8.6.1 Chỉnh các thiết bị

Cài đặt máy sắc ký (5.1) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và chỉnh như sau:

- tốc độ dòng của pha động (4.3): 0,5 ml/min đến 1,5 ml/min tùy thuộc vào cột được sử dụng (xem 5.2);
- nhiệt độ cột (5.2): tối ưu 40 °C (nhưng xem 4.3).

### 8.6.2 Phân tích HPLC

Ngay khi tốc độ dòng của pha động (4.3) và nhiệt độ ổn định, bơm lên cột 20  $\mu\text{l}$  của từng dung dịch chuẩn cafein A, B, C và D (4.7.1 đến 4.7.4) sau đó bơm dung dịch mẫu thử (thu được bằng qui trình trong 8.4.4 đối với chè đã tách cafein, qui trình trong 8.5 đối với chè và chè hòa tan thông thường) với các thể tích bằng nhau. Lặp lại việc bơm các dung dịch chuẩn ở các khoảng cách đều đặn (thường sau sáu dung dịch thử). Thu thập và ghi lại dữ liệu đối với các pic của tất cả các chất chuẩn và mẫu thử.

## 9 Tính kết quả

Nhận biết và đo diện tích pic hoặc chiều cao pic (tốt nhất là diện tích pic) đối với các chất chuẩn và mẫu. Dung đường chuẩn tuyến tính nồng độ của chất chuẩn cafein (microgam trên mililit) dựa vào diện tích pic hoặc chiều cao pic và thu lấy hệ số đáp ứng (RF), dùng hệ thống thu nhận/ tích phân dữ liệu tự động hoặc bằng tay từ điểm đã chọn trên đường chuẩn:

$$RF = \frac{C_{\text{chuẩn}}}{A_{\text{chuẩn}}} \quad \text{hoặc} \quad RF = \frac{C_{\text{chuẩn}}}{h_{\text{chuẩn}}}$$

trong đó

- RF là hệ số đáp ứng của cafein;
- $C_{\text{chuẩn}}$  là nồng độ của cafein trong dung dịch chuẩn, tính bằng microgam trên mililit ( $\mu\text{g/ml}$ );
- $A_{\text{chuẩn}}$  là diện tích pic của dung dịch chuẩn cafein;
- $h_{\text{chuẩn}}$  là chiều cao pic của dung dịch chuẩn cafein.

Hàm lượng cafein,  $w$ , được biểu thị theo phần trăm chất khô, tính bằng công thức sau đây:

$$w = A_{\text{mẫu}} \times RF \times \frac{300 \text{ d}}{m} \times \frac{100}{w_{\text{DM}}} \times \frac{100}{1\,000\,000}$$

hoặc

$$w = h_{\text{mẫu}} \times RF \times \frac{300 \text{ d}}{m} \times \frac{100}{w_{\text{DM}}} \times \frac{100}{1\,000\,000}$$

trong đó

- $A_{\text{mẫu}}$  là diện tích pic của mẫu thử;
- $h_{\text{mẫu}}$  là chiều cao pic của mẫu thử;
- RF là hệ số đáp ứng của cafein;
- $d$  là hệ số pha loãng (10 đối với chè lá và chè hòa tan);
- $m$  là khối lượng của mẫu thử, tính bằng gam (g).
- $w_{\text{DM}}$  là hàm lượng chất khô (theo khối lượng, tính bằng phần trăm), được xác định theo 8.2.



## 10 Độ chụm

### 10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm để xác định độ chụm của phương pháp được thống kê trong Phụ lục A. 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 nghiệm độc lập, đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên 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 A.1.

### 10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử nghiệm đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên 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 A.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 không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn cũng như các sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- kết quả thử nghiệm thu được; và
- nếu kiểm tra độ lặp lại, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)

**Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm**

Một phép thử liên phòng thử nghiệm được tiến hành năm 1999 dưới sự bảo hộ của Tổ chức tiêu chuẩn hóa quốc tế, cho các kết quả thống kê [đã được đánh giá theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)] nêu trong Bảng A.1.

**Bảng A.1 – Dữ liệu về độ chụm**

Nhận dạng mẫu	Mẫu <sup>a</sup>							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Số lượng các phòng thử nghiệm tham gia	11	11	11	11	11	11	11	11
Số lượng các phép thử được chấp nhận	8	8	8	8	8	7	8	8
Hàm lượng cafein trung bình, % khối lượng chất khô	4,120	3,932	0,256	0,091	0,118	0,260	7,729	5,116
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	0,102 9	0,118 2	0,009 6	0,005 4	0,007 1	0,010 4	0,296 4	0,113 2
Hệ số biến thiên lặp lại, %	2,50	3,01	3,75	5,93	6,02	4,00	3,84	2,21
Giới hạn lặp lại $r$ ( $2,8 \times s_r$ )	0,288	0,331	0,027	0,015	0,020	0,029	0,830	0,317
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$	0,165 0	0,156 4	0,012 1	0,007 9	0,007 1	0,014 0	0,355 7	0,236 1
Hệ số biến thiên tái lập, %	4,01	3,98	4,74	8,68	6,02	5,37	4,60	4,61
Giới hạn tái lập, $R$ ( $2,8 \times s_R$ )	0,462	0,438	0,034	0,022	0,020	0,039	0,996	0,661
<sup>a</sup> Mẫu A: Chè xanh Mẫu B: Chè đen (orthodox) Mẫu C: Chè đen đã tách cafein Mẫu D: Chè đen đã tách cafein Mẫu E: Chè đen đã tách cafein Mẫu F: Chè đen hòa tan đã tách cafein Mẫu G: Chè đen hòa tan Mẫu H: Chè đen hòa tan								

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 5609:2007 (ISO 1839:1980), *Chè – Lấy mẫu*
- [2] TCVN 6910-2: 2001 (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*
- [3] TCVN 9743:2013 (ISO 7516:1994), *Chè hòa tan dạng rắn – Lấy mẫu*
-