

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9745-2:2013**

**ISO 14502-2:2005**

Xuất bản lần 1

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

**PHẦN 2: HÀM LƯỢNG CATECHIN TRONG CHÈ XANH –  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Determination of substances characteristic of green and black tea –  
Part 2: Content of catechins in green tea – Method using high-performance  
liquid chromatography*

**HÀ NỘI – 2013**

## Lời nói đầu

TCVN 9745-2:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 14502-2:2005 và Đỉnh chính kỹ thuật 1:2006;

TCVN 9745-2:2013 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 đen và chè xanh – Phần 2: Hàm lượng catechin trong chè xanh – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao**

*Determination of substances characteristic of green and black tea –  
Part 2: Content of catechins in green tea – Method using high-performance  
liquid chromatography*

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định hàm lượng catechin tổng số của chè từ tổng các catechin riêng lẻ. Tiêu chuẩn này áp dụng được cho cả chè xanh hòa tan, chè xanh và các giới hạn về độ chum đối với chè đen (xem Phụ lục A).

Phương pháp này có thể dùng để xác định axit gallic, cafein, theogallin và theaflavin.

### **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

Catechin tổng số 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 catechin riêng lẻ trong dịch chiết được xác định bằng HPLC trên cột có chứa phenyl liên kết, dùng dịch rửa giải gradient có detector UV ở bước sóng 278 nm. Sử dụng chất chuẩn ngoại để định lượng. Chất chuẩn ngoại catechin có độ tinh khiết và độ ẩm đã biết có thể được dùng trực tiếp. Cách khác, cafein có thể được dùng làm chất chuẩn kết hợp với các hệ số đáp ứng tương đối (RRF) của catechin riêng lẻ được thiết lập bởi phép thử liên phòng thử nghiệm quốc tế ISO.

### 4 Thuốc thử

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

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

**4.2 Axetonitril**, loại dùng cho HPLC.

**4.3 Metanol**.

**4.4 Axit axetic**, băng, loại dùng cho HPLC.

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

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

**4.6 Dung dịch EDTA**, 10 mg/ml.

Cân (1,00 ± 0,01) g EDTA (muối dinatri của axit etylenediaminetetraaxetic, ngâm hai phân tử nước) cho vào bình định mức một vạch 100 ml. Thêm nước ấm đến nửa bình. Xoay bình để hòa tan EDTA, để nguội đến nhiệt độ phòng, pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng.

**4.7 Dung dịch axit ascorbic**, 10 mg/ml.

Cân (1,00 ± 0,01) g axit L-ascorbic cho vào bình định mức một vạch 100 ml. Hòa tan trong nước, pha loãng đến vạch và trộn.

Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng.

**4.8 Dung dịch ổn định**, axetonitril 10 % (thể tích) có axit ascorbic và EDTA nồng độ 500 µg/ml .

Dùng pipet chuyển 25 ml dung dịch EDTA (4.6), 25 ml dung dịch axit ascorbic (4.7) và 50 ml axetonitril (4.2) vào bình định mức một vạch 500 ml. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng.

#### 4.9 Pha động HPLC

**CHÚ Ý AN TOÀN – Mang găng tay, kính bảo vệ mắt và phân phối các thuốc thử trong tủ hút.**

##### 4.9.1 Pha động A, axetonitril 9 % (thể tích) axit axetic 2 % (thể tích) có EDTA 20 µg/ml

Chuyển 180 ml axetonitril (4.2) và 40 ml axit axetic (4.4) vào bình định mức một vạch dung tích 2 lít. Thêm nước đủ đến nửa bình rồi thêm 4,0 ml dung dịch EDTA (4.6). Pha loãng bằng nước đến vạch, trộn và lọc qua bộ lọc cỡ lỗ 0,45 µm (5.10).

##### 4.9.2 Pha động B, axetonitril 80 % (thể tích), axit axetic 2 % (thể tích) có EDTA 20 µg/ml

Chuyển 800 ml axetonitril (4.2) và 20 ml axit axetic (4.4) vào bình định mức một vạch dung tích 1 lít. Thêm khoảng 100 ml nước và 2,0 ml dung dịch EDTA (4.6). Pha loãng bằng nước đến vạch, trộn và lọc qua bộ lọc cỡ lỗ 0,45 µm (5.10).

#### 4.10 Dung dịch chuẩn gốc

##### 4.10.1 Yêu cầu chung

Nếu các catechin sẵn có đã biết độ tinh khiết thì chúng có thể được dùng trực tiếp làm chất chuẩn ngoại. Ngoài độ tinh khiết thông thường dùng cho HPLC, thì cần phải biết trước độ ẩm, do hàm lượng nước kết tinh ở mức cao sẽ không được tính khi đánh giá HPLC. Dữ liệu về độ tinh khiết và độ ẩm của các chất chuẩn được dùng trong phép thử liên phòng thử nghiệm được nêu trong Phụ lục B. Nếu dữ liệu về độ tinh khiết không sẵn có hoặc không thể xác định được thì các catechin chỉ được dùng làm hợp chất đánh dấu để hỗ trợ cho việc nhận biết. Trong trường hợp này, có thể tiến hành định lượng bằng cách dùng chất chuẩn ngoại cafein kết hợp với các giá trị RRF của catechin riêng lẻ (đối với cafein) thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm (xem 9.3 và Tài liệu tham khảo [3]).

##### 4.10.2 Dung dịch chuẩn gốc cafein, tương ứng với nồng độ 2,00 mg/ml

Cân (0,200 ± 0,001) g cafein khan cho vào bình định mức một vạch 100 ml. Thêm nước ấm đủ đến nửa bình. Xoay bình để hòa tan cafein sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn.

##### 4.10.3 Dung dịch chuẩn gốc axit gallic, tương ứng với axit gallic khan nồng độ khoảng 1,00 mg/ml

Đãn (0,110 ± 0,001) g axit gallic ngâm một phân tử nước (khối lượng phân tử 188,14) cho vào bình định mức một vạch 100 ml. Hòa tan trong nước, pha loãng đến vạch và trộn đều.

Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng.

Axit gallic ngâm một phân 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.

#### 4.10.4 Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc catechin riêng lẻ

Cân chính xác các lượng chất chuẩn nêu trong Bảng 1 cho vào các bình định mức một vạch riêng rẽ. Hòa tan trong dung dịch ổn định (4.8) rồi làm ấm nhẹ (tối đa 40 °C), nếu cần. Để nguội đến nhiệt độ phòng, pha loãng đến vạch bằng dung dịch ổn định và trộn.

**Bảng 1 – Dung dịch chuẩn gốc catechin**

Hợp chất chuẩn	Khối lượng chất chuẩn g	Thể tích dung dịch ổn định ml	Nồng độ danh nghĩa của chất chuẩn gốc mg/ml
(+)-Catechin	0,020 ± 0,001	20	1,0
(-)-Epicatechin	0,020 ± 0,001	20	1,0
(-)-Epigallocatechin	0,040 ± 0,001	20	2,0
(-)-Epigallocatechin gallat	0,040 ± 0,001	20	2,0
(-)-Epicatechin gallat	0,040 ± 0,001	20	2,0

Khi có đủ lượng chất chuẩn (nghĩa là > 20 mg) thì dùng cân phân tích có thể cân chính xác đến ít nhất 0,1 mg để chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc riêng lẻ. Trường hợp lượng chất chuẩn bị hạn chế (nghĩa là < 20 mg) thì có thể dùng cân chính xác đến 0,01 mg.

#### 4.11 Dung dịch chuẩn pha loãng

##### 4.11.1 Dung dịch chuẩn axit gallic pha loãng, tương ứng với nồng độ khoảng 200 µg/ml.

Dùng pipet chuyển 20 ml dung dịch chuẩn gốc axit gallic (4.10.3) vào bình định mức một vạch 100 ml. Pha loãng đến vạch bằng dung dịch ổn định (4.8) và trộn.

#### 4.11.2 Dung dịch chuẩn hỗn hợp

Chuẩn bị ba dung dịch chuẩn hỗn hợp A, B và C chứa cafein, axit gallic và các catechin sẽ được dùng cho phép ngoại chuẩn hoặc làm các hợp chất đánh dấu. Dùng pipet lấy cẩn thận các thể tích dung dịch chuẩn gốc cafein (4.10.2), dung dịch chuẩn axit gallic pha loãng (4.11.1) và dung dịch chuẩn gốc catechin riêng lẻ sẵn có (4.10.4) nêu trong Bảng 2 vào ba bình định mức một vạch riêng lẻ dung tích 20 ml. Pha loãng đến vạch bằng dung dịch ổn định (4.8) và trộn. Dùng pipet lấy 1,0 ml dịch lỏng của mỗi dung dịch chuẩn hỗn hợp cho vào các lọ nhỏ thủy tinh màu hổ phách đã được dán nhãn. Phun nhẹ bằng nitơ trước khi hàn kín và bảo quản trong tủ lạnh ở  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nồng độ danh nghĩa của các hợp chất của dung dịch chuẩn A, B và C nêu trong Bảng 3.

Với các catechin chưa biết độ tinh khiết thì trước tiên cần tiến hành đánh giá HPLC riêng lẻ để kiểm tra các hợp chất có khả năng gây nhiễu khác.

CHÚ THÍCH Nồng độ danh nghĩa của dung dịch chuẩn hỗn hợp A, B, C được nêu trong Bảng 2 và các nồng độ này được lựa chọn đã bao trùm các dải nồng độ điển hình có trong chè.

Tính nồng độ khan thực tế từ các khối lượng được dùng để chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc cùng với độ ẩm chuẩn.

Dung dịch chuẩn làm việc hỗn hợp A, B và C bền trong ít nhất 2 tháng khi được bảo quản đông lạnh ở  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Chỉ rã đông các lọ nhỏ đựng dung dịch chuẩn làm việc hỗn hợp đủ cho từng mẻ phân tích. Loại bỏ dung dịch còn sót lại và không tái kết đông.

**Bảng 2 – Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp A, B và C**

Hợp chất	Dung dịch	Các dịch lỏng cần cho việc chuẩn bị 20 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp ml		
		A	B	C
Cafein	dung dịch chuẩn gốc cafein 2,00 mg/ml (4.10.2)	0,5	1,0	1,5
Axit gallic	dung dịch chuẩn axit gallic loãng 200 µg/ml (4.11.1)	0,5	1,0	2,5
+C	dung dịch chuẩn gốc +C 1,00 mg/ml (4.10.4)	1,0	2,0	3,0
EC	dung dịch chuẩn gốc EC 1,00 mg/ml (4.10.4)	1,0	2,0	3,0
EGC	dung dịch chuẩn gốc EGC 2,00 mg/ml (4.10.4)	1,0	2,0	3,0
EGCG	dung dịch chuẩn gốc EGCG 2,00 mg/ml (4.10.4)	1,0	2,0	4,0
ECG	dung dịch chuẩn gốc ECG 2,00 mg/ml (4.10.4)	0,5	1,0	2,0

**Bảng 3 – Nồng độ danh nghĩa của các dung dịch chuẩn hỗn hợp A, B và C**

Hợp chất	Nồng độ danh nghĩa		
	µg/ml		
	A	B	C
Axit gallic	5	10	25
Cafein	50	100	150
+C	50	100	150
EC	50	100	150
EGC	100	200	300
EGCG	100	200	400
ECG	50	100	200

## 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  $\pm 0,000$  g và  $\pm 0,000$  01 g (xem 4.10.4).
- 5.2 **Nồi cách thủy**, có khả năng duy trì được ở  $(70 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .
- 5.3 **Bộ phân phối**, dùng cho hỗn hợp chiết metanol/nước (4.5), và cài đặt ở 5,0 ml.
- 5.4 **Máy ly tâm**, có thể lực ly tâm tương đối (R.C.F.) đạt 2 000 (điển hình 3 500 r/min).
- 5.5 **Máy trộn vortex**, trộn hiệu quả trong quá trình chiết.
- 5.6 **Ống chiết**, bằng thủy tinh, dung tích 10 ml, có nắp đậy và có thể chịu được khi ly tâm.
- 5.7 **Ống chia độ**, bằng thủy tinh, dung tích 10 ml, chia vạch 0,1 ml.
- 5.8 **Bình định mức một vạch**, các dung tích 5 ml, 10 ml, 20 ml, 100 ml, 500 ml, 1 l và 2 l.
- 5.9 **Pipet** thủy tinh hoặc pipet tự động, có dung tích bao trùm dải thể tích dùng cho chất chuẩn và các dịch pha loãng của dịch chiết mẫu.
- 5.10 **Dụng cụ lọc**, bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 µm dùng để lọc pha động và các dịch chiết mẫu pha loãng.



CHÚ THÍCH Bộ lọc màng PTFE và nylon đã được chứng minh là phù hợp.

Tất cả các màng lọc phải được kiểm tra để đảm bảo không giữ lại catechin.

**5.11 Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao, được trang bị để thực hiện rửa giải gradient hai kênh, có buồng cột kiểm soát nhiệt độ và detector UV cài đặt ở bước sóng 278 nm.**

**5.12 Hệ thống thu nhận dữ liệu/hệ thống tích phân.**

**5.13 Cột sắc ký dùng cho HPLC.**

CHÚ THÍCH Các pha có phenyl liên kết là lựa chọn bổ sung cho các vật liệu pha đảo, chúng cải thiện độ phân giải của các catechin. Trong tiêu chuẩn này, các điều kiện sắc ký và thành phần của pha động đã được quy định (4.9) là phù hợp đối với cột Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  Phenyl-Hexyl<sup>1)</sup> có kích thước 250 mm x 4,6 mm, được lắp bộ bảo vệ Phenomenex SecurityGuard<sup>2)</sup> có cột Phenyl-Hexyl kích thước 4 mm x 3,0 mm. Nếu sử dụng các loại cột khác thì có thể cần phải điều chỉnh pha động và các điều kiện sắc ký.

## 6 Lấy mẫu

Mẫu đại diện phải được gửi đến phòng thử nghiệm. Mẫu không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong 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 (ví dụ dạng đông khô).

## 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 riêng lẻ theo 8.2 đến 8.6 dưới các điều kiện lặp lại.

<sup>1)</sup> Phenyl-Hexyl® là 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.

<sup>2)</sup> Phenomenex SecurityGuard® là 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.

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

Tính hàm lượng chất khô từ độ ẩm (hao hụt khối lượng ở 103 °C) đã xác định được 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 ± 0,001) g mẫu thử (Điều 7) cho vào bình định mức một vạch 50 ml.

### **8.3.2 Chè**

Cân (0,200 ± 0,001) g mẫu thử (Điều 7) cho vào ống chiết (5.6).

## **8.4 Chiết 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 (8.3.1). Trộn 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 (4.5) đựng trong bộ phân phối (5.3) vào nồi cách thủy (5.2) đặt ở 70 °C và để yên trong ít nhất 30 min để cho hỗn hợp chiết cân bằng.

**8.4.2.2** Đặt ống chiết chứa mẫu (8.3.2) vào nồi cách thủy đặt ở 70 °C. Chuyển 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 (5.5).

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

Điều quan trọng là trộn kỹ mẫu để đảm bảo chiết được 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 (5.7) hoặc vào bình định mức một vạch 10 ml (5.8).

**8.4.2.6** Lặp lại các bước chiết từ 8.4.2.2 đến 8.4.2.5. Phối trộn hai dịch chiết, thêm hỗn hợp chiết nguội metanol/ nước (4.5) đến 10 ml và trộn.

**8.4.2.7** Dịch chiết từ 8.4.2.6 bền trong ít nhất 24 h nếu được bảo quản ở 4 °C. Để 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 ống chia độ (5.7). Pha loãng đến 5,0 ml bằng dung dịch ổn định (4.8). Trộn và lọc qua dụng cụ lọc cỡ lỗ 0,45 µm (5.10).

## 8.6 Xác định

### 8.6.1 Yêu cầu chung

Các catechin rất dễ bị phân hủy và nguyên nhân chính (xem Phụ lục D) là do sự nhiễm ion kim loại từ hệ thống sắc ký. Mặc dù việc bổ sung EDTA vào pha động có thể giúp giảm thiểu những ảnh hưởng này nhưng điều quan trọng là phải duy trì hệ thống sắc ký sạch. Nên rửa kỹ hệ thống trước và sau khi sử dụng, ví dụ bằng axetonitril 50 % (thể tích) (hoặc ban đầu bằng hỗn hợp dung môi thích hợp, tùy thuộc vào việc sử dụng trước đó) để loại bỏ các muối đệm dư, các axit dư và để tránh bị ăn mòn.

### 8.6.2 Chỉnh thiết bị, dụng cụ

Cài đặt máy sắc ký (5.11) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và chỉnh như sau:

- tốc độ dòng của pha động (4.9): 1,0 ml.
- các điều kiện gradient hai kênh: 100 % pha động A (4.9.1) trong 10 min, sau đó 15 min trên gradient tuyến tính đối với 68 % pha động A, 32 % pha động B (4.9.2) và cố định thành phần này trong 10 min. Sau đó cài đặt lại 100 % pha động A và để cho cân bằng trong 10 min trước khi bơm tiếp.
- Nhiệt độ cột (5.13): 35 °C ± 0,5 °C. Cần kiểm soát nhiệt độ cột (lò cột hoặc túi nước tuần hoàn) để tránh sự thay đổi trong thời gian lưu.
- detector UV cài đặt ở bước sóng 278 nm. Đảm bảo rằng dải độ nhạy của detector được lựa chọn có thể phát hiện được tất cả các pic từ chất chuẩn làm việc hỗn hợp C cao nhất trong phạm vi đo của hệ thống thu nhận dữ liệu được sử dụng.

### 8.6.3 Phân tích HPLC

Khi tốc độ dòng của pha động (4.9) và nhiệt độ ổn định thì ổn định cột bằng cách chạy gradient mẫu trắng (8.6.2). Sau đó bơm lên cột 10 µl của từng dung dịch chuẩn hỗn hợp A, B và C (4.11.2), tiếp theo

bơm dịch chiết mẫu pha loãng (8.5) cũng với thể tích này. Lập lại việc bơm các dung dịch chuẩn làm việc hỗn hợp ở các khoảng cách đều đặn (thông thường, sau khi bơm sáu dung dịch thử nghiệm). Dùng hệ thống thu nhận dữ liệu/hệ thống tích phân (5.12), thu lấy dữ liệu đối với tất cả các pic trong các chất chuẩn hỗn hợp và dung dịch mẫu thử.

Sau mỗi mẻ phân tích, rửa kỹ hệ thống sắc ký và cột bằng axetonitril 50 % (thể tích) (xem 8.6.1) và đẩy nút cột nếu không tiếp tục sử dụng để bảo quản cột.

#### 8.6.4 Nhận biết

Nhận biết các catechin riêng lẻ bằng cách so sánh thời gian lưu từ các sắc đồ của mẫu với thời gian lưu thu trong sắc đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp ở cùng điều kiện sắc ký (8.6.2). Việc sử dụng detector mảng diot cho phép phân tích phổ UV của các pic catechin và đánh giá được độ tinh khiết của pic, có thể đặc biệt hữu ích cho việc xác định các catechin ở mức thấp trong chè đen.

CHÚ THÍCH Khi không sẵn có các hợp chất đánh dấu của catechin, để hỗ trợ cho việc nhận biết thì phân tích chè xanh và so sánh với sắc đồ HPLC điển hình như trong Phụ lục C.

### 9 Tính kết quả

#### 9.1 Yêu cầu chung

Tiến hành định lượng bằng cách chuẩn ngoại, sử dụng

- các chất chuẩn catechin riêng lẻ đã được xác định độ tinh khiết và độ ẩm, hoặc
- chất chuẩn cafein được sử dụng kết hợp với các giá trị RRF của catechin riêng lẻ đo được liên quan đến cafein (xem 4.10.1 và 9.3).

#### 9.2 Định lượng bằng cách dùng các chất chuẩn catechin

9.2.1 Tính nồng độ chất chuẩn khan trong từng dung dịch chuẩn hỗn hợp A, B và C (4.11.2), chính xác đến 0,1 g/ml.

9.2.2 Dựng đường chuẩn tuyến tính đối với từng chất chuẩn từ các nồng độ khan ( $\mu\text{g/ml}$ ) dựa vào diện tích pic thu được từ hệ thống thu nhận dữ liệu/hệ thống tích phân (5.12), thu lấy giá trị độ dốc và giá trị giao điểm.

9.2.3 Hàm lượng hợp chất riêng lẻ,  $w_c$ , được biểu thị theo phần trăm khối lượng chất khô của mẫu, tính bằng công thức:

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

Trong đó

$A_{mẫu}$  là diện tích pic của hợp chất riêng lẻ trong mẫu thử;

$A_{giao\ điểm}$  là diện tích pic ở điểm giao cắt của đường chuẩn với trục y;

$S_{chuẩn}$  là độ dốc của đường chuẩn;

$V_{mẫu}$  là thể tích 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 (xem 8.5), thông thường là 5;

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

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

**9.2.4** Hàm lượng catechin tổng số,  $w_T$ , biểu thị theo phần trăm khối lượng chất khô của mẫu, được tính bằng cách lấy tổng các catechin riêng lẻ (đối với các chữ viết tắt, xem Bảng 4):

$$w_T = (\% \text{ EGC}) + (\% + \text{C}) + (\% \text{ EC}) + (\% \text{ EGCG}) + (\% \text{ ECG})$$

### 9.3 Định lượng bằng cách sử dụng chất chuẩn cafein và các hệ số đáp ứng tương đối (RRF) của catechin

**9.3.1** Các giá trị RRF (đo được đối với cafein) đối với axit gallic và các catechin riêng lẻ thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm quốc tế [3] được nêu trong Bảng 4. Các giá trị chung này thu được trên các chất chuẩn đã biết độ tinh khiết và được biểu thị theo chất chuẩn khan, giúp cho việc định lượng có thể thực hiện được bằng cách tham chiếu với chất chuẩn cafein. So sánh các kết quả thu được, dùng các chất chuẩn catechin hoặc chất chuẩn cafein với RRF của catechin nêu trong Phụ lục E.

**Bảng 4 – Hệ số đáp ứng tương đối**

Hợp chất	Hệ số đáp ứng tương đối (RRF) đối với cafein (tính theo chất chuẩn khô)
Axit gallic	0,84
(-)-Epigallocatechin (EGC)	11,24
(+)-Catechin (+C)	3,58
(-) Epicatechin (EC)	3,67
(-) Epigallocatechin gallat (EGCG)	1,72
(-) Epicatechin gallat (ECG)	1,42

## CVN 9745-2:2013

9.3.2 Dụng đường chuẩn tuyến tính cafein từ các nồng độ khan ( $\mu\text{g/ml}$ ) dựa vào các diện tích pic cafein thu được đối với từng dung dịch chuẩn hỗn hợp A, B và C (4.11.2), thu lấy giá trị độ dốc và giá trị giao điểm.

9.3.3 Hàm lượng hợp chất riêng lẻ (xem 8.6.4) xác định được, biểu thị theo phần trăm khối lượng chất khô của mẫu, tính bằng công thức:

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

Trong đó

$A_{mẫu}$  là diện tích pic của hợp chất riêng lẻ trong mẫu thử;

$A_{giao\ điểm}$  là diện tích pic ở điểm giao cắt của đường chuẩn với trục y;

$S_{cafein}$  là độ dốc đường chuẩn cafein;

$F_{chuẩn}$  là hệ số đáp ứng tương đối đo được đối với cafein dùng cho hợp chất riêng lẻ;

$V_{mẫu}$  là thể tích 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 (xem 8.5), thường là 5;

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

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

9.3.4 Hàm lượng catechin tổng số tính theo phần trăm khối lượng chất khô của mẫu, được tính bằng cách lấy tổng các catechin riêng lẻ (đối với các chữ viết tắt, xem Bảng 4):

$$w_T = (\% \text{ EGC}) + (\% \text{ +C}) + (\% \text{ EC}) + (\% \text{ EGCG}) + (\% \text{ ECG})$$

## 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 nêu 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 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 ( $r$ ) cho trong Bảng A.1.

## 10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả thử đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành cùng vật liệu giống thử 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 ( $R$ ) cho 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 nghiệm 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)

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

Các phép thử liên phòng thử nghiệm được tiến hành từ năm 1999 đến 2002 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 A.1 và Bảng A.2.

CHÚ THÍCH Các chi tiết nêu trong Tài liệu tham khảo [3]

Các kết quả trong cả Bảng A.1 và Bảng A.2 thu được từ phép định lượng, dùng chất chuẩn cafein kết hợp với hệ số đáp ứng tương đối (RRF) của catechin riêng lẻ. Các kết quả nêu trong Bảng A.1 thu được trước khi khuyến cáo kết hợp EDTA vào pha động (xem Phụ lục D), trong khi các kết quả trong Bảng A.2 thu được sau khi EDTA được bổ sung vào pha động. Hàm lượng catechin tổng số được biểu thị bằng phần trăm chất chuẩn khan và chất khô của mẫu.

**Bảng A.1 – Dữ liệu về độ chụm (không có EDTA)**

Nhận biết mẫu	Mẫu 1 Chè xanh	Mẫu 2 Chè xanh	Mẫu 3 Chè đen	Mẫu 4 Chè đen
Số lượng các phòng thử nghiệm tham gia	14	14	14	14
Số lượng các kết quả thử nghiệm được chấp nhận	9	10	11	10
Hàm lượng catechin tổng số trung bình, tính theo phần trăm khối lượng chất khô, %	12,30	15,70	9,53	7,19
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	0,194	0,163	0,221	0,095
Hệ số biến thiên lặp lại, %	1,58	1,04	2,32	1,32
Giới hạn lặp lại, $r(=2,8 s_r)$	0,54	0,46	0,62	0,27
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$	0,888	1,664	1,066	0,925
Hệ số biến thiên tái lập, %	7,22	10,60	11,19	12,87
Giới hạn tái lập, $R(=2,8 s_R)$	2,49	4,66	2,98	2,59



Bảng A.2 – Dữ liệu về độ chụm khi EDTA được bổ sung vào pha động

Nhận biết mẫu	Mẫu 1 Chè xanh	Mẫu 2 Chè xanh	Mẫu 3 Chè đen	Mẫu 4 Chè đen
Số lượng các phòng thử nghiệm tham gia	11	11	11	11
Số lượng các kết quả thử nghiệm được chấp nhận	9	9	9	9
Hàm lượng catechin tổng số trung bình, tính theo phần trăm khối lượng chất khô, %	12,14	14,78	8,93	6,81
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	0,21	0,43	0,17	0,19
Hệ số biến thiên lặp lại, %	1,75	2,93	1,87	2,75
Giới hạn lặp lại, $r(=2,8 s_r)$	0,59	1,21	0,47	0,52
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$	1,21	1,33	0,67	0,58
Hệ số biến thiên tái lập, %	10,00	8,97	7,52	8,48
Giới hạn tái lập, $R(=2,8 s_R)$	3,40	3,71	1,88	1,62
CHÚ THÍCH Chè đen, mẫu 3 và mẫu 4 đều là chè Darjeeling được lên men nhẹ, vì vậy vẫn có hàm lượng catechin vừa phải. Các loại chè đen được lên men nhiều hơn sẽ có hàm lượng catechin thấp hơn và vì vậy dự kiến sẽ ảnh hưởng xấu đến dữ liệu về độ chụm.				

## Phụ lục B

(tham khảo)

## Đánh giá độ tinh khiết của các chất chuẩn

Khi đánh giá về độ tinh khiết, kiểm tra thêm độ tinh khiết của pic HPLC, tiến hành trên các mẻ vật liệu chuẩn dùng trong phép thử liên phòng thử nghiệm. Dữ liệu về độ tinh khiết thu được nêu trong Bảng B.1.

Bảng B.1 – Dữ liệu độ tinh khiết của chất chuẩn

Chất chuẩn	Nguồn	Thông tin về độ tinh khiết được cung cấp	Độ tinh khiết	Độ tinh khiết	Độ ẩm	Độ ẩm %	
			dùng cho HPLC <sup>a</sup> % (đã được xác định)	dùng cho NMR <sup>b</sup> % (đã được xác định)	dùng cho KF % (đã được xác định)	(Các giá trị theo công thức lý thuyết dùng để so sánh)	
Axit gallic	Sigma	Dạng tinh thể, khan	100		1,7 <sup>c</sup>	Khan	0
+C	Sigma	2 H <sub>2</sub> O tối thiểu 98 %	99	92	8,0	1H <sub>2</sub> O	5,8
						2H <sub>2</sub> O	11,0
EC	Sigma		98	96	1,8	1H <sub>2</sub> O	5,8
EGC	Đã tách <sup>d</sup>	Khoảng 96 %	96	88	18,8	4H <sub>2</sub> O	19,0
EGCG	Đã tách <sup>d</sup>	Khoảng 95 %	99	91	14,4	4H <sub>2</sub> O	13,6
ECG	Đã tách <sup>d</sup>	Khoảng 97 %	99	89	13,4	4H <sub>2</sub> O	14,0

<sup>a</sup> Độ tinh khiết dùng cho HPLC là diện tích pic polyphenol tính theo % tổng diện tích của tất cả các pic trong sắc đồ.

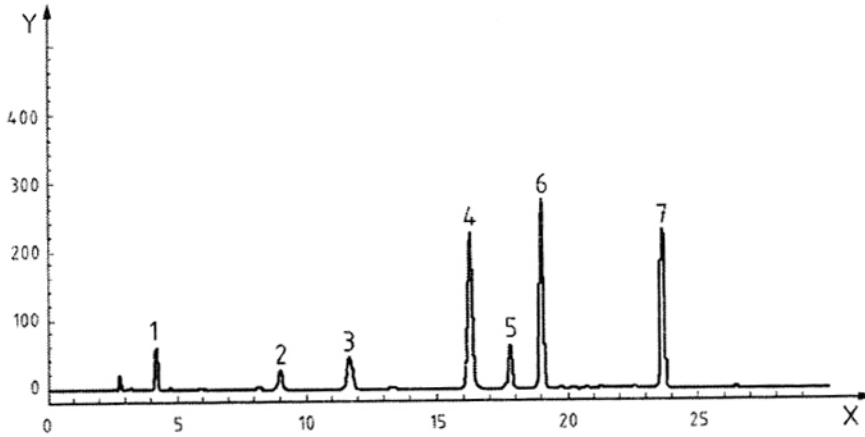
<sup>b</sup> Độ tinh khiết dùng cho NMR thu được bằng cách đếm proton dựa vào chất chuẩn cafein.

<sup>c</sup> Độ ẩm được xác định bằng máy chuẩn độ Karl-Fischer, trừ axit gallic được xác định bằng cách sấy trong tủ sấy (hao hụt khối lượng ở 103 °C).

<sup>d</sup> Được tách ra khỏi các chất hòa tan trong nước chè xanh bằng cách chiết với etyl axetat, tách được bằng cách thẩm thấu gel và tinh sạch bằng HPLC điều chế và tái kết tinh.

**Phụ lục C**

(Tham khảo)

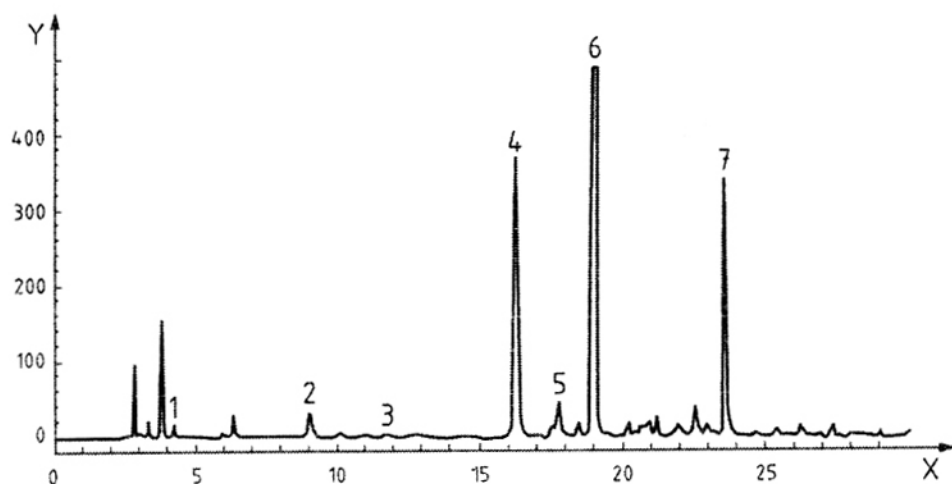
**Các sắc ký đồ HPLC điển hình****CHÚ DẪN**

X Thời gian lưu, tính bằng phút

Y Độ đáp ứng, mAU

- 1 axit gallic
- 2 EGC
- 3 catechin
- 4 cafein
- 5 epicatechin
- 6 EGCG
- 7 ECG

**Hình C.1 – Chất chuẩn catechin hỗn hợp B**



**CHÚ DẪN**

X Thời gian lưu, tính bằng phút

Y Độ đáp ứng, mAU

1 axit gallic

2 EGC

3 catechin

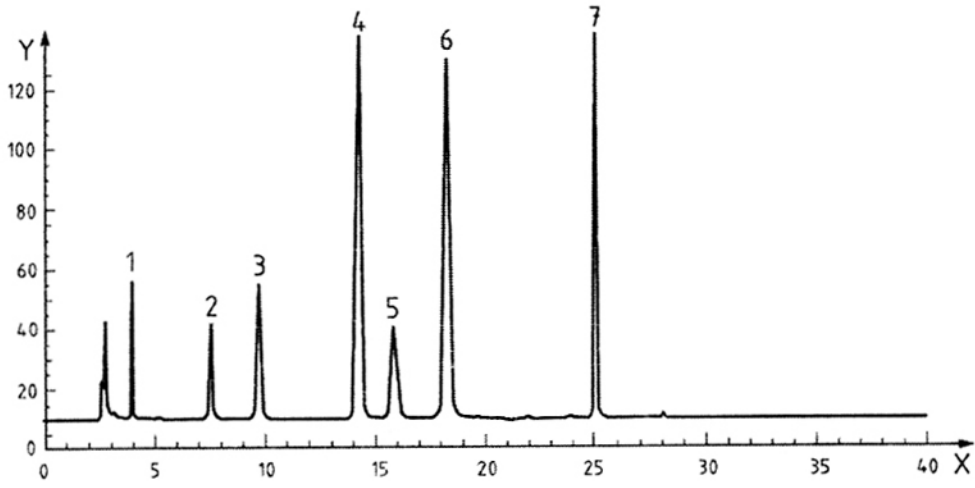
4 cafein

5 epicatechin

6 EGCG

7 ECG

**Hình C.2 – Dịch chiết chè xanh**

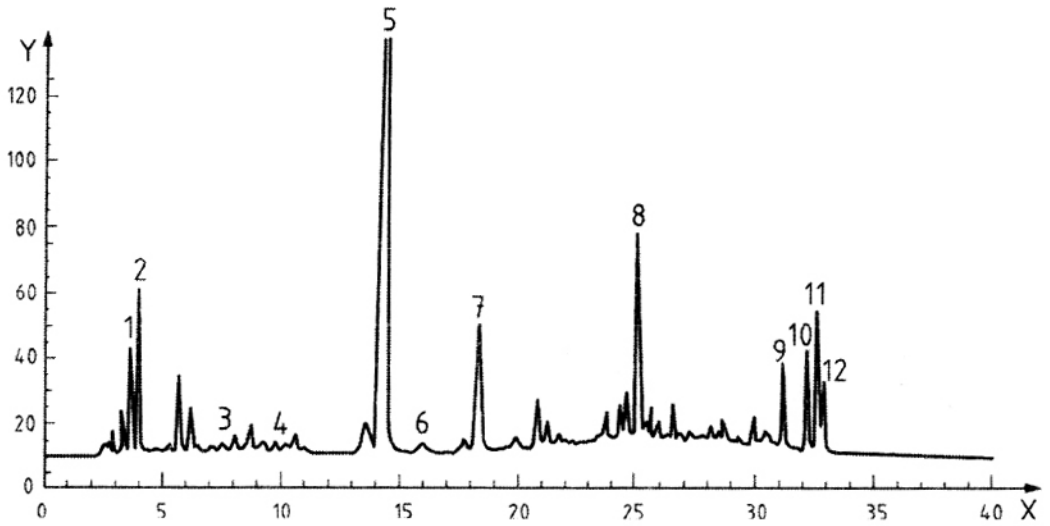
**CHÚ DẪN**

X Thời gian lưu, tính bằng phút

Y Độ đáp ứng, mAU

- 1 axit gallic
- 2 EGC
- 3 catechin
- 4 cafein
- 5 epicatechin
- 6 EGCG
- 7 ECG

Hình C.3 – Chất chuẩn catechin hỗn hợp



**CHÚ DẪN**

X Thời gian lưu, tính bằng phút

Y Độ đáp ứng, mAU

- 1 theogalin
- 2 axit gallic
- 3 EGC
- 4 catechin
- 5 cafein
- 6 epicatechin
- 7 EGCG
- 8 ECG
- 9 TF
- 10 TFDG
- 11 TF-3-MG
- 12 TF-3-MG

**Hình C.4 – Dịch chiết chè đen**

**Phụ lục D**

(tham khảo)

**Ảnh hưởng của các ion sắt đến RRF của catechin**

Dữ liệu thu được từ việc kiểm tra đánh giá này, nêu trong Bảng D.1, Hình D.1 và Hình D.2 cho thấy:

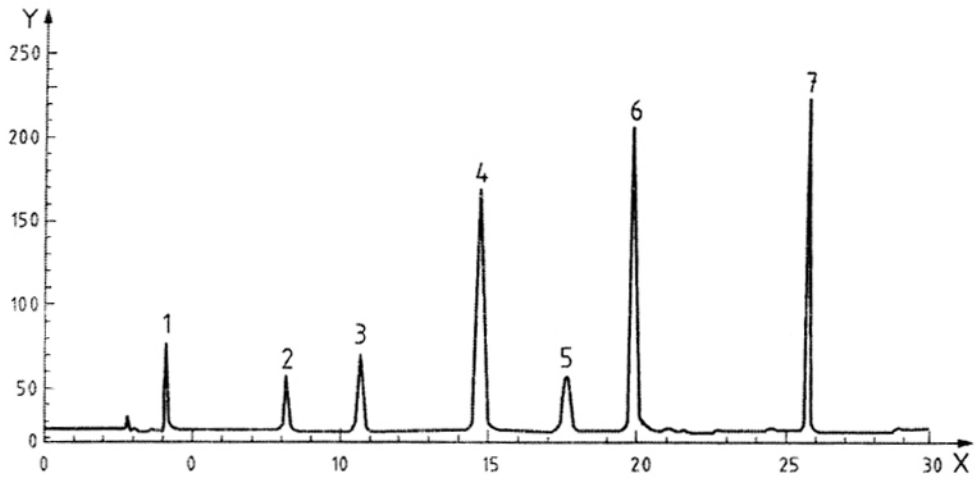
- các mức ion  $\text{Fe}^{3+}$  thấp có thể là nguyên nhân làm phân hủy các catechin trên cột;
- EGCG và EGC được cho là dễ bị phân hủy hơn;
- bổ sung EDTA 20  $\mu\text{g/ml}$  vào pha động để tách có hiệu quả các ion  $\text{Fe}^{3+}$  và ngăn ngừa sự phân hủy catechin;
- có sự phù hợp tốt nhất (trong phạm vi 5 %) thu được với RRF sau khi bổ sung EDTA.
- EDTA có mặt trong chất chuẩn catechin hỗn hợp (từ dung dịch ổn định) không bảo vệ được hệ thống sắc ký đã nhiễm bẩn;
- điều quan trọng là duy trì được hệ thống sắc ký sạch, nhưng EDTA có trong pha động sẽ cải thiện được độ chính xác của phương pháp.

**Bảng D.1 – Ảnh hưởng của  $\text{Fe}^{3+}$  đến RRF của catechin**

Hợp chất	Hệ số đáp ứng tương đối (RRF) đối với cafein (được tính theo chất chuẩn khô) <sup>a</sup>				
	RRF	Sau khi bổ sung $\text{Fe}^{3+}$ 0,1 $\mu\text{g/ml}$	Sau khi bổ sung $\text{Fe}^{3+}$ 0,5 $\mu\text{g/ml}$	Sau khi bổ sung $\text{Fe}^{3+}$ 0,5 $\mu\text{g/ml}$ và EDTA 20 $\mu\text{g/ml}$	Sau khi bổ sung EDTA 20 $\mu\text{g/ml}$
Axit gallic	0,84	0,84 [0]	1,03 [19]	0,81 [0]	0,81 [0]
EGC	11,24	16,38 [31]	24,64 [54]	11,79 [5]	11,79 [5]
+C	3,58	3,76 [5]	3,85 [7]	3,58 [0]	3,65 [2]
EC	3,67	3,99 [8]	3,92 [6]	3,75 [2]	3,86 [5]
EGCG	1,72	3,11 [45]	5,80 [70]	1,72 [0]	1,73 [0]
ECG	1,42	1,54 [8]	1,73 [18]	1,42 [0]	1,43 [0]

<sup>a</sup> % độ đáp ứng bị giảm so với RRF nêu trong [ ].

CHÚ THÍCH Các ion  $\text{Fe}^{3+}$  được lấy từ nguồn  $\text{FeCl}_3$ .



**CHÚ DẪN**

X Thời gian lưu, tính bằng phút

Y Độ đáp ứng, mAU

1 Axit gallic

2 EGC

3 catechin

4 cafein

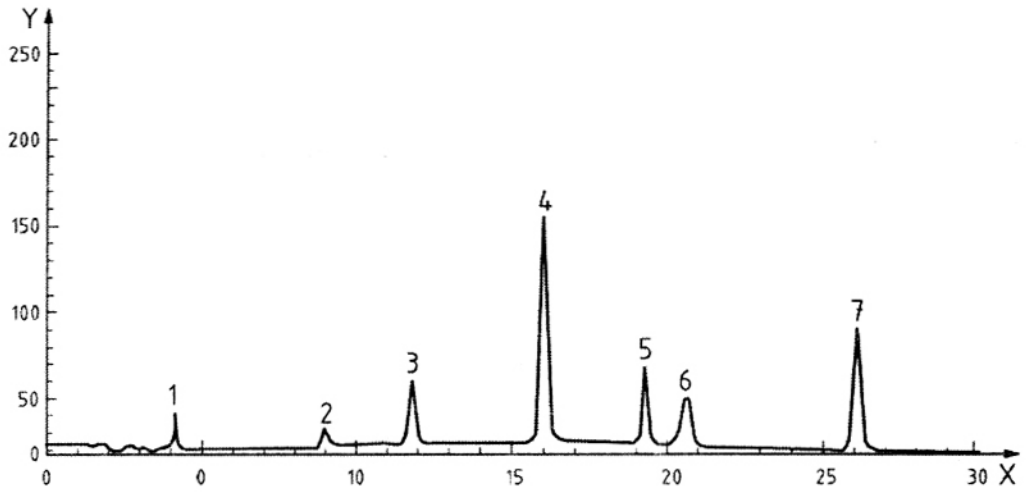
5 epicatechin

6 EGCG

7 EGC

**Hình D.1 – Chất chuẩn catechin hỗn hợp B – Các điều kiện sắc ký ban đầu chưa bổ sung EDTA**





## CHÚ DẪN

X Thời gian lưu, tính bằng phút

Y Độ đáp ứng, mAU

- 1 Axit gallic
- 2 EGC
- 3 catechin
- 4 cafein
- 5 epicatechin
- 6 EGCG
- 7 EGC

**Hình D.2 – Chất chuẩn catechin hỗn hợp B – Sau khi bổ sung  $\text{Fe}^{3+}$  0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vào pha động**

**Phụ lục E**

(Tham khảo)

**So sánh định lượng – Dùng các chất chuẩn catechin hoặc chất chuẩn cafein kết hợp với các RRF của catechin**

Các kết quả trong Bảng E.1 và Bảng E.2 cho thấy các kết quả có tính thống nhất cao khi được so sánh trong cùng một điều kiện, nghĩa là đều cùng các chất chuẩn khan và mẫu khô.

CHÚ THÍCH Các kết quả được tính từ dữ liệu thống kê có thể chấp nhận được cho trong Tài liệu tham khảo [3];

- dữ liệu về phép chuẩn ngoại ban đầu thu được dựa vào các chất chuẩn nhận được, nhưng cần phải tính lại dựa theo các chất chuẩn khan (xem Phụ lục B);
- RRF (xem Phụ lục D) được tính theo chất chuẩn khan.

**Bảng E.1 – So sánh giá trị trung bình của liên phòng thử nghiệm đối với chè xanh**

Hợp chất	Chè xanh 1			Chè xanh 2		
	Các chất chuẩn catechin		Chất chuẩn cafein với RRF của catechin	Các chất chuẩn catechin		Chất chuẩn cafein với RRF của catechin
	% mẫu khô	% chất chuẩn khan và mẫu khô	% chất chuẩn khan và mẫu khô	% mẫu khô	% chất chuẩn khan và mẫu khô	% chất chuẩn khan và mẫu khô
Axit gallic	0,10	0,10	0,13	0,08	0,08	0,10
Cafein	4,18	4,18	4,16	3,69	3,69	3,69
EGC	2,67	2,16	2,23	2,18	1,77	1,90
+C	0,15	0,14	0,20	0,72	0,66	0,74
EC	0,74	0,72	0,76	2,46	2,41	2,44
EGCG	8,68	7,43	7,37	6,05	5,18	5,23
ECG	2,11	1,82	1,75	6,29	5,44	5,39
<b>Catechin tổng số</b>	<b>14,35</b>	<b>12,27</b>	<b>12,31</b>	<b>17,70</b>	<b>15,46</b>	<b>15,70</b>

Bảng E.2 – So sánh giá trị trung bình của liên phòng thử nghiệm đối với chè xanh

Hợp chất	Chè đen 3			Chè đen 4		
	Các chất chuẩn catechin		Chất chuẩn cafein với RRF của catechin	Các chất chuẩn catechin		Chất chuẩn cafein với RRF của catechin
	% mẫu khô	% chất chuẩn khan và mẫu khô	% chất chuẩn khan và mẫu khô	% mẫu khô	% chất chuẩn khan và mẫu khô	% chất chuẩn khan và mẫu khô
Axit gallic	0,16	0,16	0,17	0,22	0,22	0,21
Cafein	4,24	4,24	4,30	4,01	4,01	4,01
EGC	1,31	1,06	1,05	0,72	0,72	0,59
+C	0,20	0,18	0,22	0,15	0,15	0,14
EC	0,42	0,42	0,43	0,46	0,46	0,45
EGCG	6,76	5,79	5,78	4,78	4,78	4,09
ECG	2,40	2,08	2,05	2,16	2,16	1,87
<b>Catechin tổng số</b>	<b>11,09</b>	<b>9,53</b>	<b>9,53</b>	<b>8,27</b>	<b>8,27</b>	<b>7,14</b>

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 5609:2007 (ISO 1939:1990), *Chè – Lấy mẫu*
  - [2] TCVN 9743:2013 (ISO 7516:1984), *Chè hòa tan dạng rắn – Lấy mẫu*
  - [3] ISO/TC34/SC8 – Tea, N513, *Report from the project leader oif the ISO rang test on ISO/CD 14502-2 (Tea – Methods for determination of substances characteristic of green and black tea – Part 2: Determination of catechins in green tea – Method using high performance liquid chromatography)*
-