ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 14502-1— 2010

ЧАЙ

Метод определения общего содержания полифенолов

ISO 14502-1:2005
Determination of substances characteristic of green and black tea — Part 1: Content of total polyphenols in tea — Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent
(IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2012

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Некоммерческой организацией «Российская ассоциация производителей чая и кофе «РОСЧАЙКОФЕ» (Ассоциация «РОСЧАЙКОФЕ») на основе аутентичного перевода на русский язык указанного в пункте 4 международного стандарта, который выполнен ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 451 «Чай, кофе и напитки на их основе»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 ноября 2010 г. № 676-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 14502-1:2005 «Определение характеристик субстанций зеленого и черного чая. Часть 1. Общее содержание полифенолов в чае. Колориметрический метод с применением реактива Folin-Ciocalteu» (ISO 14502-1:2005 «Determination of substances characteristic of green and black tea — Part : Content of total polyphenols in tea — Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent»).

Техническая поправка к указанному международному стандарту, принятая после его официальной публикации, внесена в текст настоящего стандарта и выделена двойной вертикальной линией, расположенной на полях напротив соответствующего текста, а обозначение и год принятия технической поправки приведены в скобках после соответствующего текста.

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5 (пункт 3.5).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации и межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 Некоторые элементы настоящего стандарта могут являться объектом патентных прав. ИСО не несет ответственности за идентификацию этих патентных прав

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2012

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Сущность метода . . . 1
4 Реактивы . . . 1
5 Оборудование . . . 2
6 Отбор проб . . . 3
7 Подготовка пробы . . . 3
8 Методика проведения анализа . . . 3
8.1 Общие положения . . . 3
8.2 Определение массовой доли сухого вещества . . . 3
8.3 Анализируемая проба . . . 3
8.4 Экстрагирование полифенолов . . . 3
8.5 Разбавление . . . 4
8.6 Проведение анализа . . . 4
9 Обработка результатов . . . 4
10 Прецизионность . . . 5
10.1 Межлабораторные испытания . . . 5
10.2 Повторяемость . . . 5
10.3 Воспроизводимость . . . 5
11 Протокол испытаний . . . 5
Приложение А (справочное) Градуировочная зависимость . . . 6
Приложение В (справочное) Результаты межлабораторных испытаний . . . 7
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам) . . . 8
Библиография . . . 9

Введение

ИСО 14502-1 был разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, Пищевые продукты, Подкомитетом SC 8, Чай.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЧАЙ

Метод определения общего содержания полифенолов

Tea. Method for determination of total polyphenols content

Дата введения — 2012—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает колориметрический метод определения общего содержания полифенолов в листовом и растворимом черном и зеленом чае с использованием реактива Folin-Ciocalteu.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие нормативные документы. Если указан год издания, используют только указанное издание. При отсутствии года издания используют последнее издание документа (включая любые изменения).

ИСО 1572:1980 Чай. Приготовление измельченной пробы и определение содержания сухих веществ (ISO 1572:1980, Tea — Preparation of ground sample of known dry matter content)

ИСО 3696:1987 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний (ISO 3696:1987, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods)

ИСО 7513:1990 Чай быстрорастворимый в твердой форме. Определение содержания влаги (потеря массы при 103 °С) (ISO 7513:1990, Instant tea in solid form — Determination of moisture content (loss in mass at 103 °C))

3 Сущность метода

Полифенолы экстрагируют из измельченной пробы листового чая 70 %-ным раствором метанола при температуре 70 °С. Пробу растворимого чая растворяют в горячей воде с добавлением 10 %-ного раствора ацетонитрила для стабилизации экстракта. Содержание полифенолов в экстракте определяют колориметрическим методом с применением реактива Folin-Ciocalteu. Реактив Folin-Ciocalteu содержит фосфорно-вольфрамовые кислоты, которые восстанавливаются при взаимодействии с легко окисляющимися ОН-группами фенола. При этом образуется вольфрамовая синь, обладающая характерной полосой поглощения с максимумом 765 нм, придающая исследуемому раствору синий цвет. Несмотря на то что реактив Folin-Ciocalteu по-разному взаимодействует с различными полифенолами, использование галловой кислоты в качестве стандарта позволяет достоверно определить общее содержание полифенолов.

4 Реактивы

Используют реактивы только известной степени чистоты.

4.1 Вода, соответствующая 1-й степени чистоты по ИСО 3696.

4.2 Ацетонитрил.

Издание официальное

4.3 Метанол.

4.4 Метанол водный раствор, 70 %-ный (об.)

Вносят 700 $см^3$ метанола по 4.3 в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, доливают до метки воду по 4.1 и перемешивают.

4.5 Реактив Folin-Ciocalteu.

4.6 Реактив Folin-Ciocalteu водный раствор, 10 %-ный (об.)

С помощью пипетки вносят 20 $см^3$ реактива Folin-Ciocalteu в мерную колбу вместимостью 200 $см^3$, доливают до метки воду по 4.1 и перемешивают. Раствор можно использовать в течение дня.

4.7 Карбонат натрия, 7,5 %-ный (массовая доля) водный раствор

(37,50 ± 0,01) г карбоната натрия (Na_2CO_3) помещают в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$. Доливают примерно до половины колбы теплую воду по 4.1, перемешивают до полного растворения карбоната натрия, охлаждают раствор до комнатной температуры, добавляют воду по 4.1 до метки и перемешивают. Раствор можно использовать в течение 1 мес.

4.8 Галловая кислота, исходный стандартный раствор, содержащий приблизительно 1 мг/$см^3$ безводной галловой кислоты

(0,110 ± 0,001) г моногидрата галловой кислоты (M = 188,14) помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в воде по 4.1, доводят до метки и перемешивают. Раствор можно использовать в течение дня.

Примечание — Следует использовать моногидрат галловой кислоты вследствие его меньшей гигроскопичности и большей растворимости. Если содержание массовой доли воды в исходном реагенте неизвестно, оно должно быть определено по потере массы при температуре 103 °С, после чего вычисляется концентрация исходного стандартного раствора галловой кислоты.

4.9 Галловая кислота, стандартные растворы A — E

С помощью пипеток переносят исходный стандартный раствор галловой кислоты по 4.8 в объемах, указанных в таблице 1, в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$, доводят до метки водой по 4.1 при постоянном перемешивании.

Растворы можно использовать в течение дня.

Таблица 1 — Стандартные растворы галловой кислоты

Галловая кислота, стандартный раствор	Объем исходного стандартного раствора галловой кислоты, $см^3$	Концентрация галловой кислоты в стандартном растворе, мкг/$см^3$
A	1,0	10
B	2,0	20
C	3,0	30
D	4,0	40
E	5,0	50

5 Оборудование

В дополнение к обычному лабораторному оборудованию применяют следующее оборудование.

5.1 Весы аналитические обеспечивающие точность взвешивания ± 0,001 г.

5.2 Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры (70 ± 1) °С.

5.3 Пипетка-дозатор вместимостью 5 $см^3$ для водного раствора метанола.

5.4 Центрифуга с частотой вращения 3500 об/мин.

5.5 Спектрофотометр, настроенный на длину волны 765 нм и допускающий использование кювет с длиной оптического пути 10 мм, предпочтительно с автоматизированным отделением для проточных кювет.

5.6 Пипетки автоматические или стеклянные различной вместимости.

5.7 Колбы мерные вместимостью 50, 100, 200, 500 и 1000 $см^3$.

5.8 Шейкер вортексного типа движения.

5.9 Пробирки центрифужные для экстрагирования вместимостью 10 $см^3$ с пробкой.

5.10 Пробирки градуированные вместимостью 10 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$.

Пробирки по 5.9 и 5.10 дополнительно обрабатывают 15 %-ным (об.) раствором азотной кислоты, затем тщательно промывают дистиллированной водой и высушивают при температуре 100 °С. На заключительной стадии колориметрического анализа можно использовать одноразовые пластиковые пробирки, т.к. в этом случае их дополнительная обработка не требуется.

6 Отбор проб

Представительную пробу отправляют в лабораторию, не допуская повреждений при транспортировании или хранении.

Отбор проб для листового чая — по ИСО 1839, для растворимого чая — по ИСО 7516.

7 Подготовка пробы

Для обеспечения однородности листовой чай измельчают по ИСО 1572 и хранят в герметичных контейнерах, обеспечивающих защиту от солнечного света.

Измельчение растворимого чая требуется только в случае, если он содержит крупные частицы.

8 Методика проведения анализа

8.1 Общие положения

Если требуется проверка повторяемости результатов (см. 10.2), проводят два последовательных измерения в соответствии с 8.2—8.6.

8.2 Определение массовой доли сухого вещества

Рассчитывают массовую долю сухого вещества в пробе в зависимости от массовой доли влаги (по потере массы при температуре 103 °С), определенной в соответствии с ИСО 1572 для листового чая и по ИСО 7513 для растворимого чая.

8.3 Анализируемая проба

8.3.1 Чай растворимый

(0,500 ± 0,001) г подготовленной согласно разделу 7 пробы помещают в мерную колбу вместимостью 5 $см^3$.

8.3.2 Чай листовой

(0,200 ± 0,001) г подготовленной согласно разделу 7 пробы помещают в пробирку для экстрагирования по 5.9.

8.4 Экстрагирование полифенолов

8.4.1 Чай растворимый

8.4.1.1 Добавляют в мерную колбу с пробой (8.3.1) приблизительно 25 $см^3$ горячей воды (максимальная температура 60 °С). Перемешивают до полного растворения пробы и охлаждают до комнатной температуры.

8.4.1.2 Вносят 5,0 $см^3$ ацетонитрила. Добавляют воду по 4.1 до метки и перемешивают.

8.4.2 Чай листовой

8.4.2.1 С помощью пипетки-дозатора по 5.3 помещают водный раствор метанола по 4.4 на водяную баню по 5.2 с температурой воды 70 °С и выдерживают в течение 30 мин.

8.4.2.2 Помещают пробирку для экстракции с пробой по 8.3.2 на водяную баню с температурой воды 70 °С. Помещают 5,0 $см^3$ водного раствора метанола по 8.4.2.1 в пробирку для экстрагирования, закрывают пробкой и перемешивают на шейкере вортексного типа движения по 5.8.

8.4.2.3 Продолжают нагревать пробирку для экстрагирования на водяной бане в течение 10 мин, перемешивая содержимое на шейкере через 5 и 10 мин.

Для обеспечения полной экстракции необходимо тщательно перемешивать пробу.

8.4.2.4 Извлекают пробирку из водяной бани и охлаждают до комнатной температуры. Извлекают пробку, помещают пробирку в центрифугу и центрифугируют в течение 10 мин при частоте вращения 3500 об/мин.

8.4.2.5 Тщательно декантируют жидкость в градуированную пробирку.

8.4.2.6 Повторяют экстракцию по 8.4.2.2—8.4.2.5. Объединяют экстракты, доводят объем до 10,0 $см^3$ холодным водным раствором метанола и перемешивают.

8.4.2.7 Экстракт по 8.4.2.6 хранят в течение 24 ч при температуре 4 °С. Перед проведением анализа экстракт доводят до комнатной температуры. При появлении в экстракте небольшого количества осадка его отделение не требуется.

8.5 Разбавление

С помощью пипетки помещают 1,0 $см^3$ экстракта растворимого чая по 8.4.1.2 или листового чая по 8.4.2.6 в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Добавляют воду по 4.1 до метки и перемешивают.

8.6 Проведение анализа

8.6.1 С помощью пипетки помещают по 1,0 $см^3$ стандартных растворов галловой кислоты A, B, C, D и E по 4.9 в двух повторностях в отдельные градуированные пробирки по 5.10.

Примечание — Данный объем соответствует 10, 20, 30, 40 и 50 мкг безводной галловой кислоты.

8.6.2 С помощью пипетки вносят по 1,0 $см^3$ дистиллированной воды в двух повторностях в отдельные градуированные пробирки по 5.10. Это холостые пробы.

8.6.3 С помощью пипетки вносят по 1,0 $см^3$ разбавленного экстракта по 8.5 в двух повторностях в градуированные пробирки.

8.6.4 С помощью пипетки добавляют по 5,0 $см^3$ водного раствора реактива Folin-Ciocalteu по 4.6 в каждую из пробирок и перемешивают.

8.6.5 Через 3—8 мин после добавления реактива Folin-Ciocalteu в каждую из пробирок добавляют по 4,0 $см^3$ раствора карбоната натрия по 4.7 в каждую градуированную пробирку. Закрывают пробирки пробками и перемешивают.

8.6.6 Выдерживают растворы в течение 60 мин при комнатной температуре, с помощью спектрофотометра по 5.5 измеряют оптическую плотность растворов относительно воды по 4.1 в кювете с длиной оптического пути 10 мм и при длине волны 765 нм.

8.6.7 Оптическая плотность холостых проб не должна превышать 0,01. Более высокие значения являются признаком загрязнений, связанных с использованием воды, реактивов или лабораторной посуды недостаточной чистоты. Также необходимо, чтобы измеряемая величина оптической плотности не выходила за пределы диапазона, для которого была проведена градуировка. Если оптическая плотность пробы выше оптической плотности стандартного раствора галловой кислоты E, повторяют колориметрический анализ после разбавления пробы по 8.5.

9 Обработка результатов

9.1 Вычисляют с точностью до 0,1 мкг массовое содержание галловой кислоты m, мкг, в 1 $см^3$ стандартных растворов A, B, C, D и E по 4.9, приготовленных по 8.6.1, по формуле

$$m = \frac{m_0 \cdot V \cdot w_{DM,std} \cdot 10000}{100 \cdot 100},$$

где m_0 — масса моногидрата галловой кислоты, использованная для приготовления исходного стандартного раствора галловой кислоты по 4.8, г;

V — объем исходного стандартного раствора галловой кислоты, взятый для приготовления стандартных растворов A, B, C, D и E галловой кислоты по 4.9, $см^3$;

$w_{DM,std}$ — массовая доля безводной галловой кислоты, %.

9.2 Строят линейный градуировочный график зависимости массовой концентрации галловой кислоты в стандартных растворах A, B, C, D и E (4.9), вычисленной по 9.1, от оптической плотности исходного стандартного раствора галловой кислоты по 4.8 за вычетом оптической плотности холостой пробы.

Определяют коэффициенты линейной зависимости. Типичная градуировочная зависимость представлена в приложении А. Коэффициент наклона округляют до 0,0001. Градуировочная прямая должна пересекать ось y вблизи начала координат. В случае пересечения прямой с осью y в точке с координатой

$y > \pm 0{,}04$ проверяют влажность галловой кислоты, правильность приготовления исходного стандартного раствора и калибровку пипетки.

Массовую долю полифенолов w_T, %, вычисляют по формуле

$$w_T = \frac{(D_{sample} - D_{intercept}) \cdot V_{sample} d \cdot 100}{S_{std} \cdot m_{sample} \cdot 10000 \cdot w_{DM,sample}},$$

где D_{sample} — оптическая плотность раствора;

$D_{intercept}$ — оптическая плотность, соответствующая точке пересечения калибровочной зависимости с осью y;

S_{std} — тангенс угла наклона градуировочной прямой;

m_{sample} — масса пробы, г;

V_{sample} — объем экстракта (10 см^3 для чая, 50 см^3 для чая растворимого), см^3;

d — коэффициент разбавления, используемый до колориметрического анализа (обычно 1—100 см^3, таким образом коэффициент разбавления — 100);

$w_{DM,\ sample}$ — массовая доля сухого вещества в пробе определенная по 8.2, %.

10 Прецизионность

10.1 Межлабораторные испытания

Условия и результаты межлабораторных испытаний приведены в приложении В. Результаты, полученные в межлабораторных испытаниях, применяют только для указанных пределов концентраций и основных веществ.

10.2 Повторяемость

Абсолютное значение разности двух независимых испытаний, проведенных с использованием одного и того же метода и на одном и том же испытуемом материале в одной и той же лаборатории на одном и том же оборудовании одним и тем же оператором в течение небольшого промежутка времени, не должны превышать значений предела повторяемости r, приведенных в приложении В (таблице В.1), более чем в 5 % испытаний.

10.3 Воспроизводимость

Абсолютное значение разности двух независимых испытаний, проведенных с использованием одного и того же метода и на одном и том же испытуемом материале в различных лабораториях на различном оборудовании разными операторами, не должны превышать значений предела воспроизводимости R, приведенных в приложении В (таблице В.1), более чем в 5 % испытаний.

11 Протокол испытаний

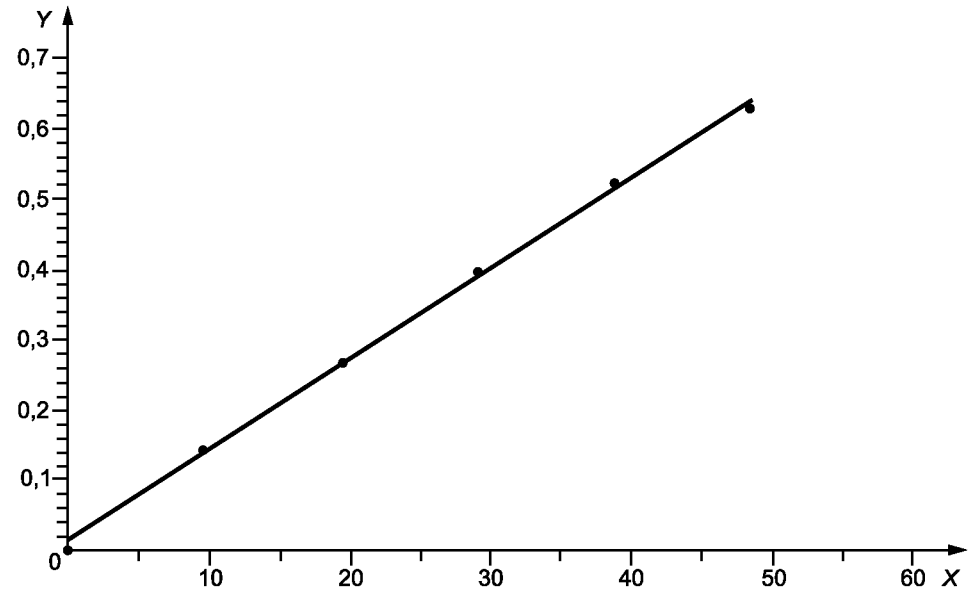
Протокол испытаний должен содержать:

- информацию, необходимую для идентификации пробы;
- информацию о методе отбора пробы;
- информацию о методе испытания со ссылкой на настоящий стандарт;
- детали испытаний, не учтенные настоящим стандартом, информацию об обстоятельствах, которые могли повлиять на результаты испытаний;
- результаты испытаний;
- информацию о повторяемости результатов испытания.

Приложение А
(справочное)

Градуировочная зависимость

А.1 Градуировочная зависимость приведена на рисунке А.1.



X: Массовая концентрация галловой кислоты (мкг/см^3).
Y: Оптическая плотность на длине волны 765 нм.
$y = 0{,}0132\,x + 0{,}0113$ (*Cor* 1:2006).
$R^2 = 0{,}9985$.
Коэффициент наклона = 0,0132.
Координата точки пересечения градуировочной прямой с осью $y = 0{,}0113$.

Рисунок — А.1

Приложение В
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

В.1 В межлабораторных испытаниях, проведенных в 2001 г. под эгидой Международной организации стандартизации, были получены следующие результаты по ИСО 5725-2, приведенные в таблице В.1.

Т а б л и ц а В.1 — Значения пределов повторяемости и воспроизводимости

Показатели	Чай зеленый листовой A	Чай черный листовой B	Чай черный листовой C
Количество лабораторий	23	23	23
Количество принятых результатов	20	20	20
Среднее общее содержание полифенолов, % (мас.)	24,35	18,81	13,95
Стандартное отклонение повторяемости S_r	0,332	0,218	0,214
Коэффициент вариации повторяемости, %	1,36	1,16	1,53
Предел повторяемости r ($r = 2{,}8\ S_r$)	0,93	0,61	0,60
Стандартное отклонение воспроизводимости S_R	1,129	1,186	1,029
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	4,64	6,31	7,38
Предел воспроизводимости R ($R = 2{,}8\ S_R$)	3,16	3,32	2,88

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам)

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 1572	MOD	ГОСТ 28550—90 (ИСО 1572—80) «Чай. Метод приготовления измельченной пробы и определения сухих веществ»
ИСО 3696:1987	MOD	ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия»
ИСО 7513	—	*
ИСО 5725-2:1994	IDT	ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений»

* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты;
- MOD — модифицированные стандарты.

Библиография

ISO 1839:1980, *Tea — Sampling*

ISO 7516:1984, *Instant tea in solid form — Sampling*

ISO 5725-2:1994, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2.Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*

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

УДК 663.95:006.34 ОКС 67.140.10 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: чай листовой, чай растворимый, чай зеленый, чай черный, полифенолы, колориметрический метод, реактив Folin-Ciocalteu

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 21.12.2011. Подписано в печать 11.01.2012. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,00. Тираж 131 экз. Зак. 24.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru