

TCVN 6604 : 2000
ISO 4052 : 1983

CÀ PHÊ - XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CAFEIN
(PHƯƠNG PHÁP CHUẨN)

*Coffee – Determination of caffeine content
(reference method)*

HÀ NỘI - 2000

Lời nói đầu

TCVN 6604 : 2000 hoàn toàn tương đương với ISO 4052 :1983;

TCVN 6604 : 2000 thay thế cho TCVN 5703 : 1993;

TCVN 6604 : 2000 do Ban kỹ thuật TCVN/TC/ F16 Cà phê và sản phẩm cà phê biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị , Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường ban hành.

Cà phê – Xác định hàm lượng caffeine (phương pháp chuẩn)

Coffee – Determination of caffeine content (Reference method)

0 Giới thiệu

Phương pháp mô tả trong tiêu chuẩn này đã được chọn, qua nghiên cứu so sánh nhiều phương pháp, vì tính khả thi, độ tái lập, tính đặc trưng, tính dễ áp dụng và tính nhanh chóng của nó, sau khi đã chọn từ một số phương pháp và đã tiến hành nghiên cứu so sánh giữa các phương pháp đó.

Tuy nhiên, phương pháp này đặc biệt nhạy đối với các thay đổi trong việc vận dụng và do đó luôn phải tuân thủ các hướng dẫn thực hành trong mọi chi tiết.

1 Phạm vi và lĩnh vực áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp chuẩn để xác định hàm lượng caphêin trong cà phê.

Phương pháp này có thể áp dụng cho cà phê nhân, cà phê nhân đã loại bỏ caphêin, của hạt cà phê rang, cà phê rang đã loại bỏ caphêin, chất lỏng và chất khô chiết được từ cà phê, chất lỏng và chất khô chiết được từ cà phê đã loại bỏ caphêin.

Giới hạn dưới của phát hiện là 0,02 % caphêin trong chất khô.

2 Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 6536 : 1999 (ISO 1447 : 1978) Cà phê nhân - Xác định độ ẩm (phương pháp thông thường).

TCVN 5567: 1991 (ISO 3726 : 1983) Cà phê tan – Xác định khối lượng hao hụt khi sấy ở 70°C dưới áp suất thấp.

TCVN 6539 : 1999 (ISO 4072 : 1982) Cà phê nhân đóng trong bao - Lấy mẫu.

TCVN 6605 : 2000 (ISO 6670 : 1983) Cà phê tan đựng trong thùng có lót - Lấy mẫu.

ISO 6673 Cà phê nhân - Xác định khối lượng hao hụt khi sấy ở 105 °C.

3 Nguyên tắc

Chiết caphêin từ phần mẫu thử trong môi trường amoniac. Tinh chế tiếp bằng dietyl ete trên 2 cột sắc ký, cột thứ nhất có môi trường kiềm, cột thứ 2 có môi trường axit, sau đó rửa giải caphêin bằng cloroform.

Đo phổ của chất rửa giải ở bước sóng hấp thụ cực đại (trong vùng cực tím).

4 Thuốc thử

Chỉ được dùng các thuốc thử đạt chất lượng phân tích. Nước dùng phải là nước cất hoặc nước ít nhất có độ tinh khiết tương đương.

4.1 Axit sunfuaric, 200 g/l [$c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 2 \text{ mol/l}$].

4.2 Dung dịch natri hydroxit, 80 g/l [$c(\text{NaOH}) \approx 2 \text{ mol/l}$].

4.3 Đất Diatomit

Sản phẩm được dùng phải đảm bảo thu hồi ít nhất 98 % caphêin từ phần mẫu thử.

Chú thích – Celite 545 là chất thích hợp.

4.4 Dung dịch amoniac 70 g/l (1 thể tích dung dịch amoniac đậm đặc, $\rho_{20} \approx 0,9$ g/ml, + 2 thể tích nước).

4.5 Dietyl ete, tinh khiết hoặc đã được làm tinh khiết lại (xem 7.5) bằng chạy sắc ký dưới đây, và cho bão hoà với nước.

Cho 800 ml dietyl ete chạy qua cột chứa 100g oxit nhôm kiềm có hoạt tính độ 1. Dietyl ete sau khi được làm tinh chế như vậy cần phải bảo quản trong chai tối màu cho đến khi sử dụng.

(Hoặc là, dietyl ete vừa mới chưng cất và không chứa peroxit, có thể được dùng thay cho dietyl ete làm tinh chế bằng sắc ký).

4.6 Caphêin, [1,3,7-trimetyl-2,6 dioxopurine ($C_8H_{10}N_4O_2$)], tinh khiết, khan.

4.7 Cloroform, tinh khiết hoặc được làm tinh khiết (xem 7.5) bằng chạy sắc ký như qui định trong 4.5, và cho bão hoà với nước.

5 Thiết bị, dụng cụ

5.1 Cột sắc ký (xem hình 1), dài 250 mm, đường kính trong 21 mm (cột I) và đường kính trong 17 mm (cột II), và có van khoá thích hợp nhất là của PTFE.

5.2 Máy đo phổ tử ngoại, có độ chính xác tới 0,004 đơn vị hấp thụ trong dải sử dụng.

5.3 Cuvet bằng silica với đường quang dài 10 mm.

5.4 Các dụng cụ thí nghiệm thông thường, bao gồm

5.4.1 Cốc thí nghiệm, dung tích 100 ml.

5.4.2 Nồi cách thuỷ.

5.4.3 Bình định mức 1 vạch, dung tích 50, 100, 1 000 ml.

5.4.4 Pipet 1 vạch, dung tích 2 ml và 5 ml.

5.4.5 Cân phân tích

5.5 Cối xay cà phê, thích hợp để xay hạt cà phê rang.

5.6 Máy xay kiểu đĩa có răng, có vỏ làm mát, hoặc máy xay phân tích có bộ phận cắt và vỏ làm mát, hoặc cối xay tương ứng thích hợp để xay hạt cà phê nhân.

5.7 Bộ rây thí nghiệm, đan bằng lưới kim loại kích thước tiêu chuẩn của mắt rây là 600 μm hoặc 630 μm , đáp ứng được các yêu cầu của ISO 3310/1.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu phải phù hợp với các phương pháp qui định ở các tiêu chuẩn thích hợp.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Nếu cần thiết, nghiền mẫu, sử dụng dụng cụ thích hợp được qui định tương ứng trong 5.5 hoặc 5.6 cho đến khi mẫu lọt được qua rây (5.7).

7.2 Xác định hàm lượng chất khô

Tính hàm lượng chất khô sau khi đã xác định độ ẩm trong 1 phần của mẫu thử (7.1) theo các phương pháp được qui định trong các tiêu chuẩn tương ứng.

7.3 Phần mẫu thử

7.3.1 Cà phê nhân và cà phê đã rang

Cân khoảng 1 g mẫu thử (7.1) chính xác tới 0,1g. Cho mẫu vào 1 cốc thí nghiệm 100 ml (5.4.1), thêm 5 ml dung dịch amoniac (4.4) và làm nóng trong nồi cách thủy (5.4.2) 2 phút. Để cho nguội sau đó chuyển sang bình định mức 100 ml (5.4.3), cho thêm nước đến vạch và khuấy. Để cho dung dịch đục này lắng xuống, sau đó dùng pipet (5.4.4) lấy 5,0 ml dung dịch chuyển vào 1 cốc thí nghiệm (5.4.1) cho thêm 6 g diatomit (4.3) và khuấy thật kỹ.

7.3.2 Chất chiết khô của cà phê

Tiến hành như qui định trong 7.3.1, nhưng lấy 0,5 g phần mẫu thử, và lấy 2ml dung dịch đục, và 3 g đất diatomit.

7.3.3 Chất chiết lỏng của cà phê

Tiến hành như qui định trong 7.3.1, nhưng lấy 1 đến 2,5 g phần mẫu thử tương ứng khoảng 0,5 g cà phê tan khô, và lấy 2 ml hỗn hợp dung dịch đục, và 3 g đất diatomit.

7.3.4 Cà phê nhân đã loại caphêin và cà phê rang đã loại caphêin

Cân lấy 1 g mẫu thử (7.1) chính xác tới 0,1g. Cho mẫu vào 1 cốc thí nghiệm 100 ml (5.4.1), thêm 5 ml dung dịch amoniac (4.4) và hâm nóng trong nồi cách thủy (5.4.2) 2 phút. cho thêm 6 g đất diatomit (4.3) và khuấy kỹ.

7.3.5 Chất chiết khô của cà phê đã loại caphêin

Tiến hành như qui định trong 7.3.4, nhưng lấy 0,5 g mẫu thử.

7.3.6 Chất chiết lỏng của cà phê đã loại caphêin

Tiến hành như qui định trong 7.3.4, nhưng lấy 1 đến 2,5 g mẫu thử, tương ứng khoảng 0,5 g cà phê tan khô, và 7 đến 8 g đất diatomit.

7.4 Tiến hành xác định

7.4.1 Nhồi đầy các cột

7.4.1.1 Cột I (cột kiềm)

7.4.1.1.1 Lớp A

Trộn cẩn thận 3 g diatomit (4.3) và 2 ml dung dịch hydroxit natri (4.2.) bằng dao trộn mềm, cho đến khi đồng nhất (xem chú thích). Thu được bột hơi ướt. Cho 1 phần, khoảng 2 mg bột lên cột sắc ký đường kính 21 mm (5.1), đầu dưới của cột được nhồi bằng bông hoặc len thủy tinh. Sau mỗi lần đưa bột lên cột, dùng đũa thủy tinh có 1 đầu phẳng khít với đường kính trong của cột lèn nhẹ lên để có một lớp đồng nhất và kết chặt với nhau. Có thể dùng 1 miếng bông hoặc len thủy tinh nhỏ để phủ lên trên mặt lớp A.

Chú thích – Chất liệu nhồi cột có thể được chuẩn bị trước và bảo quản trong vật chứa kín. Mỗi cột kiểm cân 5,16 g.

7.4.1.1.2 Lớp B

Chuyển hỗn hợp đất diatomit và mẫu thử (7.3) vào cột lên trên mặt lớp A. Làm khô cốc thí nghiệm 2 lần, với khoảng 1 g đất diatomit (4.3) rồi cho diatomit này vào cột. Lèn nhẹ xuống để có được 1 lớp đồng nhất và phủ 1 miếng bông hoặc len thủy tinh lên trên mặt lớp B.

7.4.1.2 Cột II (cột axit)

Cho lên cột sắc ký đường kính 17 mm (5.1), đầu dưới của cột được nhồi bằng len thủy tinh, 3 g diatomit (4.3) và 3 ml dung dịch axit sunphuric (4.1) trộn cẩn thận và nhồi vào cột như đã mô tả đối với lớp A của cột I trong 7.4.1.1. Dùng 1 miếng len thủy tinh để phủ lên trên mặt lớp này.

Chú thích – Chất liệu nhồi cột có thể được chuẩn bị trước và bảo quản trong vật chứa kín. Mỗi cột kiểm cân 6,36 g.

7.4.2 Chạy sắc ký

Dựng các cột chồng lên nhau, sao cho khi chất chảy ra từ cột I sẽ giọt trực tiếp vào cột II. Cho 150 ml dietyl ete (4.5) chảy qua cả 2 cột. Điều chỉnh van khoá của cột 2 sao cho còn 1 lượng chất lỏng trên bề mặt lớp (cột II). Tháo cột I ra. Cho 50 ml dietyl ete (4.5) chảy qua cột II, dùng 1 phần dietyl ete để rửa miệng cột I rồi cho nốt phần này lên cột II. Cho chất lỏng chảy hết khỏi cột II.

Chú thích – Dietyl ete đã dùng có thể tái sinh bằng cách lắc khuấy trong sắt(II) sunphat.

Thổi luồng không khí từ đỉnh xuống đáy cột II (thí dụ dùng quả bóp cao su), cho đến khi không còn dietyl ete nhỏ giọt từ cột và luồng không khí từ van khoá chỉ thoáng thoảng có mùi dietyl ete (xem cảnh báo sau). Dùng 45 đến 50 ml cloroform (4.7) để làm trôi chất hấp thụ trên cột II. Thu chất trôi ra vào bình thể tích 50 ml một vạch (5.4.3), dùng cloroform pha loãng tới vạch (4.7) và khuấy kỹ.

Tốc độ chảy của dietyl ete và của cloroform dưới điều kiện chảy tự nhiên phải nằm trong khoảng từ 1,5 ml/phút đến 3 ml/phút. Nếu vượt quá tốc độ này phải nghi ngờ có chảy xói và tiến hành xác định lại.

Cảnh báo – Việc cho dietyl ete và cloroform phải được thực hiện trong tủ hút thông gió tốt để đề phòng cả khả năng hít phải hơi dung môi và lẫn cả khả năng nổ.

7.4.3 Đo quang phổ (xem hình 2)

7.4.3.1 Đo dung dịch thử

Để tránh sai sót do cloroform bay hơi, dùng cuvet silica (5.3) đo độ hấp thụ của dung dịch caphêin trong cloroform (7.4.2) đối chiếu với cloroform (4.7) trên máy đo quang phổ được dùng ở bước sóng hấp thụ cực đại (khoảng 276 nm), và ở các bước sóng trên và dưới bước sóng này 30 nm nhằm kiểm tra độ tinh khiết của caphêin thu được.

Nếu như độ hấp thụ cực đại vượt quá khả năng đo chính xác của máy sử dụng thì tiến hành đo lại với một phần thử khác của dung dịch caphêin được pha loãng trong cloroform (7.4.2). Trong trường hợp đó khi tính kết quả cần chú ý đến hệ số pha loãng; những thừa số thích hợp của công thức nêu trong 8.1.1, 8.1.2 và 8.1.3 cũng phải được điều chỉnh cho phù hợp. Nếu độ hấp thụ cực đại thấp hơn 0,2 thì tiến hành lại trên phần thử khác có khối lượng lớn hơn.

7.4.3.2 Chuẩn bị và đo dung dịch chuẩn (đối chứng)

Chuẩn bị dung dịch caffeine chuẩn theo cách như sau :

Cân lấy $100 \text{ mg} \pm 20 \text{ mg}$ caffeine khan tinh khiết (4.6), chính xác tới 0,1 mg. Cho vào bình định mức dung tích 1 000 ml (5.4.3) hoà tan trong cloroform và pha loãng đến vạch. Dùng pipet (5.4.4) chuyển 5,0 ml dung dịch này vào bình định mức dung tích 50 ml (5.4.3) và pha loãng đến vạch bằng cloroform.

Đo độ hấp thụ của dung dịch này theo mô tả trong 7.4.3.1. Độ hấp thụ đúng của dung dịch chuẩn (xem 8.1.1 và hình 2) phải nằm trong vùng 0,4.

7.4.4 Số lần xác định

Tiến hành hai phép xác định trên các phần thử riêng rẽ lấy từ cùng một mẫu thử.

7.5 Thử trắng

Tiến hành thử trắng trên các thuốc thử, sử dụng qui trình đã mô tả ở trên, nhưng bỏ qua phần mẫu thử.

Trước khi sử dụng các thuốc thử đã tái tinh chế (xem 4.5 và 4.7), cần lặp lại thử trắng để kiểm tra độ tinh khiết của chúng.

8 Biểu thị kết quả

8.1 Phương pháp và công thức tính

8.1.1 Cà phê nhân và cà phê đã rang

Hàm lượng caffeine của mẫu, biểu thị bằng gam trên 100 gam chất khô, bằng:

$$\frac{10^7 \times c \times A_1}{A_2 \times m \times p}$$

trong đó

c là nồng độ của caffeine trong dung dịch chuẩn (7.4.3.2), bằng gam trên mililit ;

A_1 là độ hấp thụ đúng của chất caffeine (7.4.2) chất chiết tinh khiết thu được trong 7.4.3.1, nghĩa là

$$(A_1)_\lambda = \frac{(A_1)_{\lambda-30nm} + (A_1)_{\lambda+30nm}}{2}$$

trong đó λ chỉ bước sóng hấp thụ cực đại (khoảng 276 nm);

A_2 là độ hấp thụ đúng của dung dịch caffeine chuẩn (7.4.3.2), nghĩa là

$$(A_2)_\lambda = \frac{(A_2)_{\lambda-30nm} + (A_2)_{\lambda+30nm}}{2}$$

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

P là hàm lượng chất khô của mẫu, tính bằng phần trăm khối lượng (xem 7.2).

8.1.2 Chất chiết từ cà phê dạng khô và dạng lỏng

Hàm lượng caffeine của mẫu, tính bằng gam trên 100 gam chất khô, theo công thức:

$$\frac{25 \times 10^6 \times c \times A_1}{A_2 \times m \times P}$$

Trong đó các ký hiệu như dùng như trong 8.1.1.

8.1.3 Cà phê nhân, cà phê rang đã loại caffeine, chất chiết khô của cà phê đã loại caffeine và chất chiết lỏng của cà phê đã loại caffeine.

Hàm lượng caffeine của mẫu, tính bằng gam trên 100 gam chất khô, theo công thức:

$$\frac{5 \times 10^5 \times c \times A_1}{A_2 \times m \times P}$$

trong đó các ký hiệu giống như trong 8.1.1.

8.1.4 Kết quả

Lấy kết quả là trung bình cộng của các giá trị thu được với điều kiện thoả mãn yêu cầu về độ lặp lại (xem 8.2).

8.2 Độ lặp lại

Chênh lệch giữa các kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được khi tiến hành đồng thời hay sau một khoảng thời gian ngắn, áp dụng một phương pháp, tiến hành trên cùng một mẫu thử, ở một phòng thí nghiệm, do cùng một kỹ thuật viên thực hiện, dùng cùng một loại dụng cụ không được vượt quá giá trị nêu trong bảng.

8.3 Độ tái lập

Chênh lệch giữa các kết quả thu được của hai phép thử riêng rẽ khi áp dụng cùng một phương pháp, trên cùng một mẫu thử, thực hiện ở các phòng thí nghiệm khác nhau, do các kỹ thuật viên khác nhau, sử dụng các dụng cụ khác nhau không được vượt quá giá trị nêu trong bảng.

9 Báo cáo kết quả

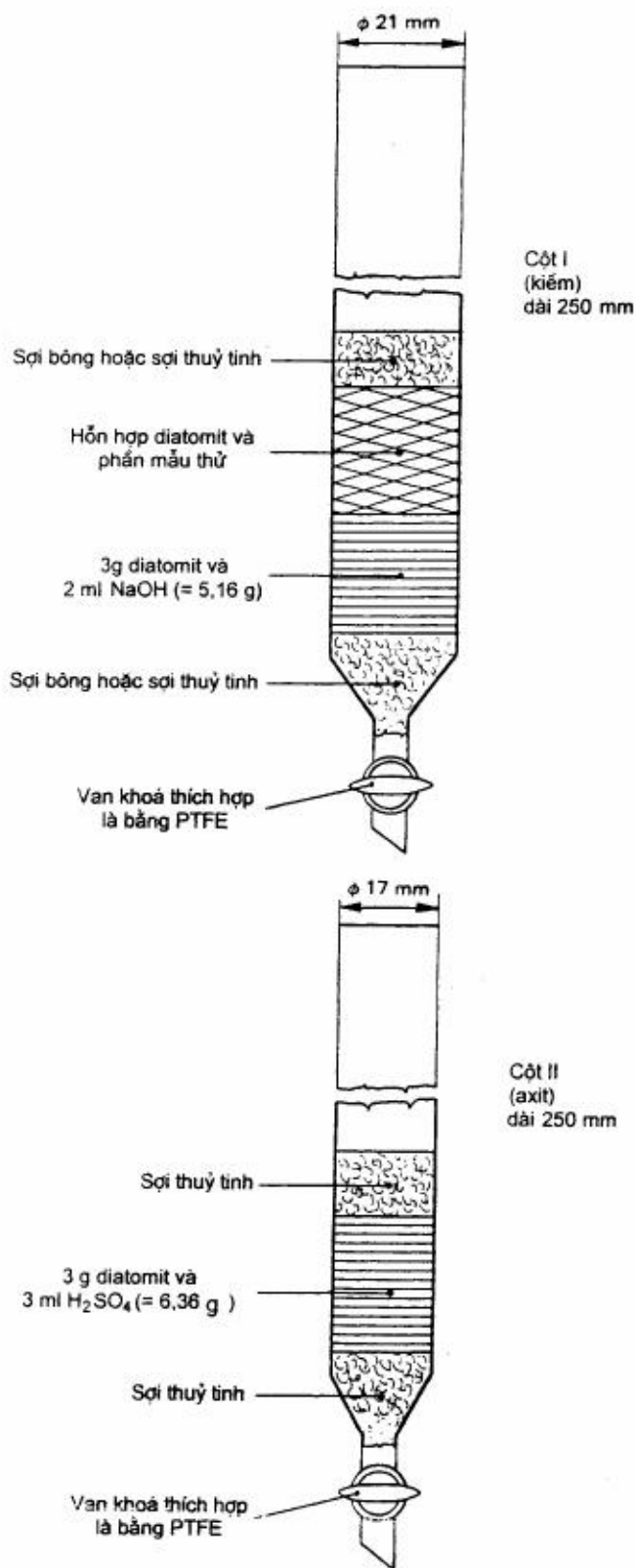
Báo cáo kết quả phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được. Cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Báo cáo kết quả cũng bao gồm tất cả các thông tin cần thiết về việc nhận biết hoàn toàn mẫu thử.

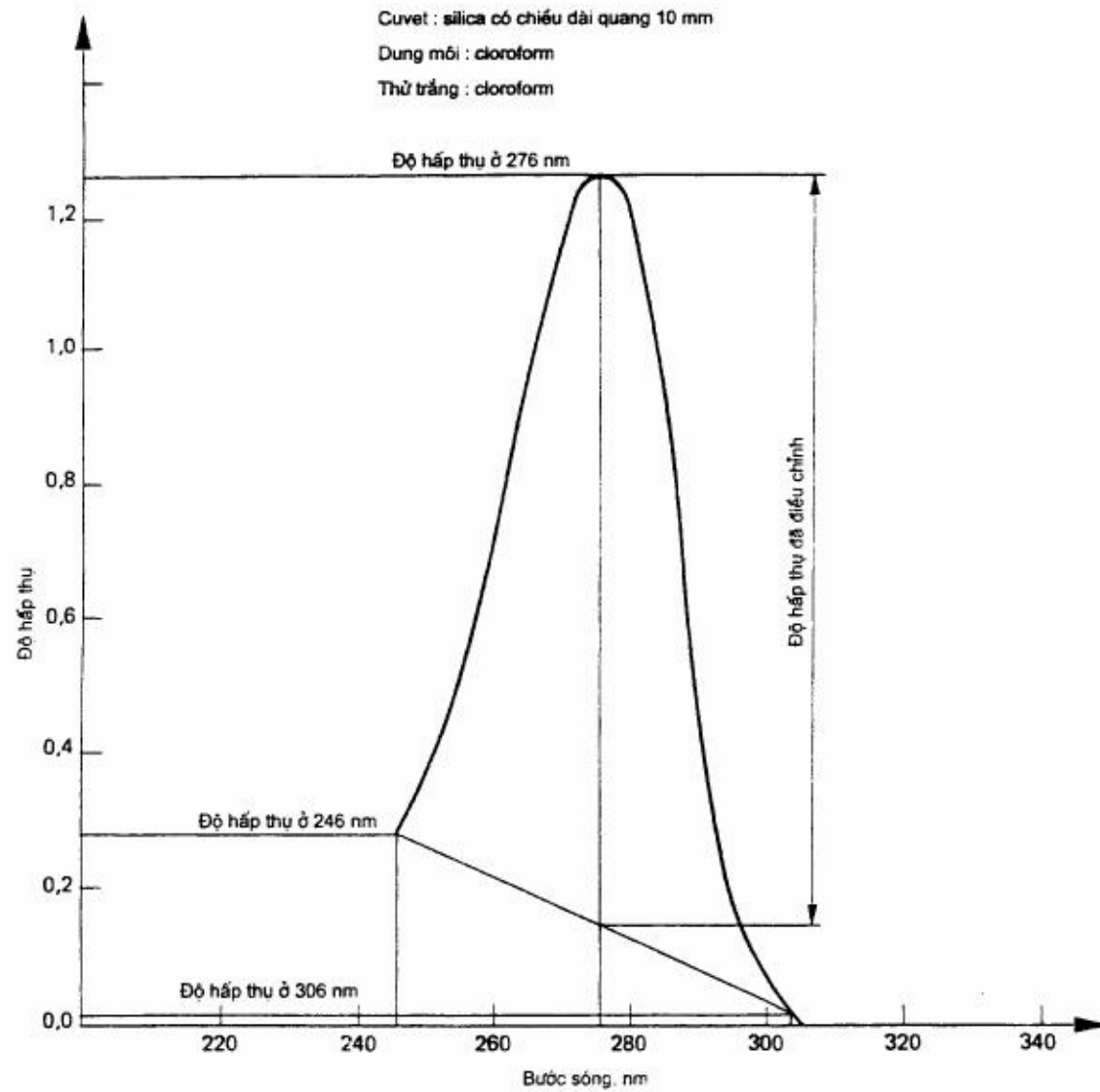
Bảng - Độ lặp lại và độ tái lập

| Mẫu | Lượng caphêin g/ 100g cà phê | Độ lặp lại * g caphêin/100g cà phê | Độ tái lập * g caphêin/100g cà phê |
|--------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Hạt cà phê nhân | khoảng 2 | 0,12 | 0,38 |
| | khoảng 1 | 0,08 | 0,31 |
| | Đã loại bỏ caphêin < 0,1 | < 0,01 | 0,01 |
| Hạt cà phê rang | khoảng 2 | 0,10 | 0,32 |
| | khoảng 1 | 0,04 | 0,19 |
| | Đã loại bỏ caphêin < 0,1 | < 0,01 | 0,01 |
| Cà phê ở dạng lỏng | Khoảng 4 | 0,17 | 0,39 |
| | Khoảng 2 | 0,12 | 0,20 |
| | Đã loại bỏ caphêin < 0,3 | 0,01 | 0,01 |

* Các trị số của độ lặp lại và độ tái lập là các hiệu số tới hạn ở mức xác suất 95%



Hình 1 – Cột sắc ký



Hình 2 – Thí dụ về đo phổ