

TCVN 6603 : 2000

ISO 10095 : 1992

CÀ PHÊ - XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CAPHÊIN -  
PHƯƠNG PHÁP DÙNG SẮC KÝ LỎNG CAO ÁP

*Coffee - Determination of caffeine content - Method using high -  
performance liquid chromatography*

HÀ NỘI - 2000

## Lời nói đầu

TCVN 6603 : 2000 hoàn toàn tương đương với ISO 10095 : 1992;

TCVN 6603 : 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 dùng sắc ký lỏng cao áp

*Coffee - 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 cao áp (HPLC) để xác định hàm lượng caffeine của cà phê nhân và cà phê rang đã khử caffeine, của bột chiết của cà phê thường và cà phê đã khử caffeine.

Chú thích 1 – Phương pháp chuẩn để xác định hàm lượng caffeine bằng phương pháp đo phổ hấp thụ cực tím trong TCVN 6604 : 2000 (ISO 4052 : 1983). Cà phê - Xác định hàm lượng caffeine (phương pháp chuẩn).

### 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 ở 70°C dưới áp suất thấp.

ISO 6673 : 1983 Cà phê nhân – Xác định khối lượng hao hụt ở 105°C.

### 3 Nguyên tắc

Chiết caffeine từ phần mẫu thử bằng nước ở 90 °C với sự có mặt của magiê oxit. Lọc và sau đó tinh chế phần chất lỏng trên vi cột silic đioxyt đã được cải biến bằng các nhóm phenyl.

Sắc ký lỏng cao áp để xác định hàm lượng caffeine bằng phát hiện tia tử ngoại.

### 4 Thuốc thử

Nếu không có qui định khác, chỉ được dùng các thuốc thử thuộc loại phân tích, và nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

**4.1 Metanol**, loại dùng cho HPLC.

**4.2 Dung dịch amoniac (0,3 mol/l) metanol**, hỗn hợp tỷ lệ 90 + 10 theo thể tích.

**4.3 Dung môi rửa giải**, dùng cho cột tinh chế, hỗn hợp metanol/ nước/ axit axêtic tỷ lệ 75 + 25 + 1 theo thể tích.

**4.4 Pha động**, hỗn hợp metanol/ nước, tỷ lệ 30 + 70 theo thể tích.

Cho 600 ml metanol (4.1) vào bình định mức dung tích 2 lít và cho nước vào đến vạch. Trộn kỹ sau đó lọc hỗn hợp qua màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45  $\mu\text{m}$  (5.7).

Chú thích 2 – Bằng cách điều chỉnh nồng độ metanol có thể thay đổi thời gian lưu giữ của caphêin sao cho đạt được sự chia tách tối ưu trong HPLC.

**4.5 Etanol/ nước**, dung dịch tỷ lệ 1 + 4 theo thể tích.

**4.6 Oxit magie**

**4.7 Caphêin, dung dịch gốc**, tương ứng với 0,5 g caphêin trong một lít.

Cân, chính xác tới 0,1 mg, 125 mg caphêin cho vào bình thủy tinh màu hổ phách thể tích 250 ml của cùng hỗn hợp etanol / nước. Cho thêm etanol / nước (4.5) đủ đến nửa bình. Hoà tan hết caphêin và sau đó thêm đến vạch.

Dung dịch này có thể bảo quản được 1 tháng trong tủ lạnh.

**4.8 Caphêin, các dung dịch chuẩn.**

**4.8.1 Dung dịch chuẩn A**, tương ứng với 0,010 g caphêin trên lít, để dùng cho các sản phẩm đã được loại caphêin.

Để cho dung dịch gốc (4,7) ấm lên đến nhiệt độ phòng. Dùng pipet (5.12) lấy 2 ml dung dịch gốc này cho vào bình thể tích 100 ml một vạch. Cho nước đầy đến vạch và trộn.

Pha dung dịch này trong ngày sử dụng.

**4.8.2 Dung dịch chuẩn B**, tương ứng với 0,05 g caphêin trong lít, để dùng cho các sản phẩm thông thường.

Để cho dung dịch gốc (4,7) ấm lên đến nhiệt độ phòng. Dùng pipet (5.12) lấy 5 ml dung dịch gốc này cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Cho nước đầy đến vạch và trộn.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị thí nghiệm thông thường và đặc biệt là các dụng cụ sau:

**5.1 Máy sắc ký lỏng cao áp**, có trang bị detector cực tím, cho phép đo trong vùng bước sóng từ 254 nm đến 280 nm, và có trang bị máy ghi. Bước sóng càng gần với 280 nm là tốt bởi vì pic hấp thụ cực đại của caphêin ở 272 nm.

**5.2 Cột sắc ký để chạy HPLC**, loại  $C_{18}$ , tốt nhất là được nhồi bằng các hạt hình cầu rỗng và có ít nhất đủ 5000 đĩa lý thuyết.

Số đĩa lý thuyết  $N$  của cột có thể được tính như sau theo hình dạng của các pic thu được bằng bơm dung dịch caphêin chuẩn tinh khiết (4.8).

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

trong đó

$t$  là thời gian lưu giữ của pic;

$w_{0,5}$  là độ rộng pic tại giữa đường cao của pic.

**5.3 Cột tinh chế**, để chạy sắc ký pha ngược, dung tích 3 ml, được nhồi bằng silica được cải biến bằng các nhóm phenyl, kích thước trung bình của các hạt là 40  $\mu\text{m}$ .

**5.4 Máy xay cà phê**, thích hợp để xay hạt cà phê đã rang.

**5.5 Máy nghiền cà phê** có bánh răng và vỏ làm mát hoặc máy nghiền phân tích có lưới sắt và vỏ làm mát, hoặc các loại máy nghiền khác thích hợp để nghiền hạt cà phê nhân.

**5.6 Bộ rây thí nghiệm**, đan bằng lưới kim loại kích thước mắt rây là 630  $\mu\text{m}$ .

**5.7 Bộ lọc**, kích thước lỗ là 0, 45  $\mu\text{m}$ .

**5.8 Nồi cách thủy**, có khả năng điều chỉnh nhiệt độ ở  $90 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  và khuấy được liên tục.

**5.9 Cân phân tích**, có thể cân chính xác tới 0,000 1 g.

**5.10 Chai**, dung tích 250 ml có nắp vặn xoáy

**5.11 Bình định mức 1 vạch**, dung tích 10 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml và 2 lit.

**5.12 Pipet**, dung tích 2,0 ml ; 5,0 ml và 10,0 ml.

## **6 Lấy mẫu**

Việc lấy mẫu cà phê nhân đóng trong bao được tiến hành theo TCVN 6539 : 1999 (ISO 4072 : 1982).

Việc lấy mẫu cà phê tan đựng trong thùng có lớp lót được tiến hành theo TCVN 6605 : 2000 (ISO 6670 : 1983).

## **7 Chuẩn bị mẫu thử**

Nếu cần thiết phải nghiền mẫu bằng dụng cụ thích hợp được quy định trong 5.4 hoặc 5.5 cho đến khi mẫu lọt được qua rây (5.6).

## **8 Cách tiến hành**

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

Tính hàm lượng chất khô từ hàm lượng nước xác định được trong 1 phần của mẫu thử (điều 7) theo :

- TCVN 6536 : 1999 (ISO 1447) hoặc ISO 6673 đối với cà phê nhân;
- ISO 3727 đối với cà phê tan, hoặc ;
- theo các tiêu chuẩn khác áp dụng cho cà phê và cho các sản phẩm khác chế biến từ cà phê.

### **8.2 Phần mẫu thử**

#### **8.2.1 Cà phê nhân hoặc rang thông thường và đã loại caphêin**

Cân lấy 1 g mẫu thử (điều 7) chính xác tới 0,0001g.

#### **8.2.2 Bột cà phê chiết thông thường và đã loại caphêin**

Cân lấy 0,5 g mẫu thử (điều 7) chính xác tới 0,0001g.

### **8.3 Chiết chất caphêin**

**8.3.1** Cho phần mẫu thử (8.2.1) hoặc (8.2.2) vào chai dung tích 250 ml (5.10). Thêm 4 g  $\pm$  0,5 g oxit magie (4.6) và 100 g nước. Cân chai cùng các chất đựng bên trong, chính xác tới 0,1 g.

**8.3.2** Đóng nắp chai và trộn kỹ các chất trong chai. Đặt chai đã chứa các chất vào nồi cách thủy (5.8) và đun nóng đến 90 °C đồng thời khuấy liên tục trong vòng 20 phút.

Để nguội chai cùng các chất chứa bên trong và cân lại chính xác đến 0,1 g. Khối lượng của chai nguội cùng các chất đựng bên trong phải bằng khối lượng xác định được trong 8.3.1.

8.3.3 Nếu khối lượng của 2 lần cân khác nhau, thực hiện chiết khác (8.3.1 và 8.3.2) sử dụng phần mẫu thử khác.

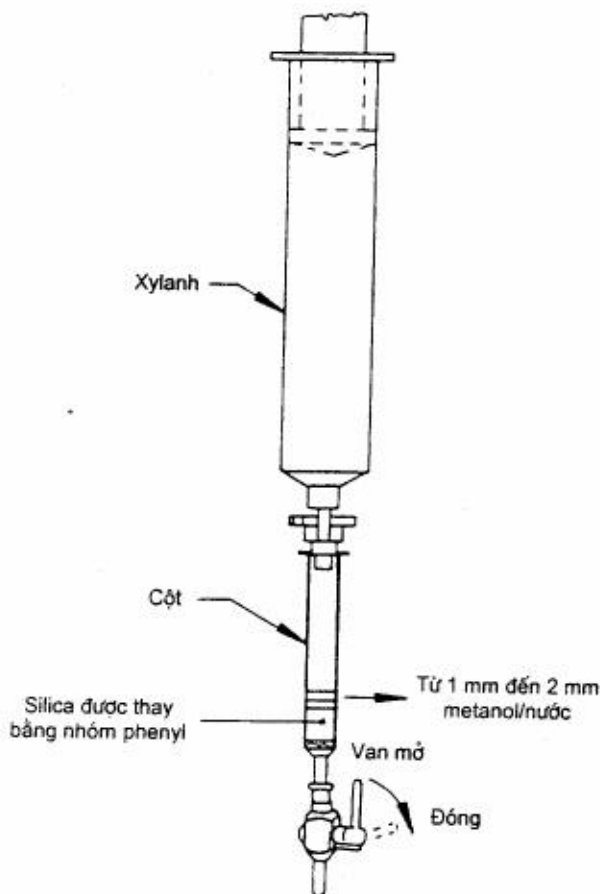
8.3.4 Để cho dung dịch tĩnh. Lọc dung dịch qua bộ lọc (5.7).

#### 8.4 Tinh chế dung dịch

Trước mỗi lần chiết tách dung dịch, hoạt hoá cột tinh chế (5.3).

##### 8.4.1 Chuẩn bị cột tinh chế

Lắp cột tinh chế như vẽ trên hình 1.



Hình 1 - Chuẩn bị cột tinh chế

Mở van khoá và rửa cột bằng 5 ml metanol (4.1), điều chỉnh van khoá để cho metanol chảy từng giọt. Khi còn lại khoảng 1 mm đến 2 mm metanol ở phía trên bề mặt silica thì đóng van. Cho thêm 5 ml nước, mở van và khi nào còn 1 mm đến 2 mm nước ở phía trên bề mặt silica thì lại đóng van.

Không để cho cột bị khô, nếu không, phải tiến hành chuẩn bị lại.

#### **8.4.2 Hấp thụ caphêin**

Dùng pipet để đưa vào cột, hoặc :

- a) 2,0 ml dung dịch đã lọc thu được trong 8.3.3 trong trường hợp là cà phê thường hoặc cà phê chiết, hoặc
- b) 10,0 ml dung dịch đã lọc thu được trong 8.3.4 trong trường hợp là cà phê đã khử caphêin hoặc cà phê chiết đã khử caphêin.

Điều chỉnh van để cho dung dịch chảy từng giọt. Khi bề mặt của dung dịch hạ thấp xuống ngay dưới bề mặt của silica thì đóng van.

#### **8.4.3 Khử những thành phần không cần thiết**

Mở van khoá và cho 2,5 ml hỗn hợp dung dịch amoniac/metanol (4.2). Đóng van khi bề mặt của hỗn hợp hạ thấp ngay sát dưới bề mặt của silica. Cho thêm tiếp 2,5 ml hỗn hợp (4.2) nữa và để hỗn hợp chảy hết khỏi cột. Thổi khoảng 20 ml không khí qua cột để khử tối đa hỗn hợp (4.2)

Chú thích 3 – Ở giai đoạn này của quy trình cột có thể bị khô.

#### **8.4.4 Rửa giải caphêin**

Đặt 1 bình định mức dung tích 10 ml một vạch (5.11) phía dưới cột. Mở van và cho 7,5 ml dung môi rửa giải (4.3), điều chỉnh van để cho dung môi chảy từng giọt. Để cho dung môi rửa giải chảy hết vào bình. Cho nước vào đến vạch và trộn kỹ.

Chú thích 4 – Cột tinh chế có thể được tái sinh bằng metanol như qui định 8.4.1. Có thể sử dụng đến 10 lần cho mục đích tinh chế.

### **8.5 Phân tích bằng HPLC**

#### **8.5.1 Hiệu chỉnh thiết bị.**

Bật máy sắc ký (5.1) và hiệu chỉnh máy như sau:

- Tốc độ dòng chảy của pha động (4.4) : từ 0,5 ml/ phút đến 1,5 ml/ phút tùy theo loại cột được dùng (xem 5.2)
- Nhiệt độ của cột (5.2) : 40 °C

Chú thích 5 – Có thể tăng pic tách bằng cách tăng nhiệt độ của cột nhưng không được quá 60 °C.



### 8.5.2 Phân tích

Khi tốc độ dòng chảy của pha động (4.4) và nhiệt độ ổn định, bơm vào cột 10 µl dung dịch mẫu thử thu được trong 8.4.4 và sau đó bơm một thể tích như vậy dung dịch caphêin chuẩn (4.8.1 hoặc 4.8.2).

Chú thích 6 – Trong qui trình bình thường, định luật Beer được tuân thủ với nồng độ chất caphêin tới 0,0250g/l. Mức này có cao hơn so với nồng độ caphêin áp dụng trong phương pháp thử này. Tuy nhiên, nếu điều này không phải do sai lệch của thiết bị, vẫn phải xây dựng đường hiệu chuẩn các nồng độ caphêin.

## 9 Tính và biểu thị kết quả

Hàm lượng caphêin trong mẫu được biểu thị bằng gam trên 100 g chất khô như sau:

9.1 Đối với cà phê nhân sống hoặc đã rang và bột cà phê tan:

$$\frac{Ax}{Ac} \times c_1 \times \frac{10 \times 100}{2 \times m_0 \times 1000} \times \frac{100}{RS} \times 100$$

trong đó

$A_x$  là diện tích pic caphêin thu được với dung dịch mẫu thử ;

$A_c$  là diện tích pic caphêin thu được với dung dịch chuẩn ;

$c_1$  là nồng độ của dung dịch caphêin chuẩn (8.4.2), tính bằng gam trên lit ;

$m_0$  là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam ;

RS là hàm lượng chất khô của mẫu, tính phần trăm theo khối lượng (xem 8.1).

9.2 Đối với cà phê nhân sống hoặc rang và bột cà phê đều đã khử caphêin:

$$\frac{Ax}{Ac} \times c_2 \times \frac{10 \times 100}{10 \times m_0 \times 1000} \times \frac{100}{RS} \times 100$$

trong đó

$c_2$  là nồng độ của dung dịch caphêin chuẩn (8.4.1), tính bằng gam trên lit ;

## 10 Độ chính xác

### 10.1 Các kết quả thử của liên phòng thí nghiệm

Một thử nghiệm của liên phòng thí nghiệm đã tiến hành năm 1987 của ISO/TC 34/SC 15 cà phê, gồm 18 phòng thí nghiệm tham gia. Các giá trị về độ tái lập và độ lặp lại thu được trong bảng 1. Phương án lấy mẫu và quy trình thử tuân thủ phương án của liên thí nghiệm phù hợp với sự phân công được nêu trong ISO 5725.

**Bảng 1- Độ lặp lại và độ tái lập**

Mẫu	Hàm lượng caphêin g/ 100g cà phê	Độ lặp lại g caphêin/ 100 g cà phê	Độ tái lập g caphêin/ 100 g cà phê
Hạt cà phê nhân đã rang	≈ 2	0,07	0,34
Hạt cà phê nhân rang đã loại bỏ chất caphêin	≈ 1	0,04	0,12
Hạt cà phê nhân rang đã loại bỏ chất caphêin	< 0,1	0,01	0,02
Cà phê tan	≈ 4	0,09	0,36
Cà phê tan đã loại bỏ caphêin	< 0,3	0,02	0,03

### 10.2 Độ lặp lại

Sự khác nhau tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được khi áp dụng một phương pháp, trên cùng một mẫu thử, tại một phòng thí nghiệm, do một kỹ thuật viên thực hiện, dùng cùng một loại dụng cụ trong một khoảng ngắn thời gian phải không được vượt quá giá trị nêu trong bảng 1.

### 10.3 Độ tái lập

Sự khác nhau tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được 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 dùng dụng cụ khác nhau thực hiện phải không được vượt quá giá trị nêu trong bảng 1.

## 11 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ ra phương pháp 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.

## Phụ lục A

(Tài liệu tham khảo)

### Thư mục

- 1 TCVN 6539 :1999 (ISO 4072:1982), Cà phê nhân đóng bao – Lấy mẫu.
- 2 ISO 5725:1986, Độ chính xác của phương pháp thử – Xác định độ lặp lại và độ tái lập cho phương pháp thử chuẩn bởi liên phòng thí nghiệm.
- 3 TCVN 6605 : 2000 (ISO 6670:1983), Cà phê tan đựng trong thùng có lót - Lấy mẫu.