

TCVN 13839:2023

Xuất bản lần 1

**CÀ PHÊ VÀ SẢN PHẨM CÀ PHÊ – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
16-O-METHYLCAFEOSTOL TRONG CÀ PHÊ RANG –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

*Coffee and coffee products – Determination of 16-O-methylcafestol content
in roasted coffee – Method using high-performance liquid chromatography (HPLC)*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13839:2023 được xây dựng trên cơ sở tham khảo DIN 10779:2011-03 *Untersuchung von Kaffee und Kaffee-Erzeugnissen – Bestimmung des Gehaltes an 16-O-Methylcafestol in Röstkaffee – HPLC-Verfahren*;

TCVN 13839:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F16 Cà phê và sản phẩm cà phê biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Cà phê và các sản phẩm cà phê –

Xác định hàm lượng 16-O-methylcafestol trong cà phê rang –

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Coffee and coffee products – Determination of 16-O-methylcafestol content in roasted coffee – Method using high-performance liquid chromatography (HPLC)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định hàm lượng 16-O-methylcafestol trong cà phê rang.

Phương pháp này đã được xác nhận giá trị sử dụng trên cà phê rang có 16-O-methylcafestol từ 50 mg/kg đến 300 mg/kg.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. 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 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

ISO 3310-1, *Test sieves - Technical requirements and testing – Part 1: Test sieves of metal wire cloth* (Sàng thử nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và thử nghiệm. Phần 1: Sàn thử nghiệm lưới kim loại)

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Hàm lượng 16-O-methylcafestol (16-O-methylcafestol content)

Hàm lượng chất xác định được theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng 16-O-methylcafestol được biểu thị bằng miligam trên kilôgam (mg/kg).

4 Nguyên tắc

Chất béo được chiết ra khỏi mẫu đã nghiền bằng tert-butyl methyl ete (tBME). Sau khi chiết, chất béo có trong cà phê được xà phòng hóa bằng cách đun hồi lưu dung dịch kali hydroxit trong etanol, sau đó chất không xà phòng hóa được tách bằng cách lắc với tBME.

Sau khi loại dung môi bằng chưng cất, hoà một lượng xác định diclorometan (5.4) vào phần cặn thu được. Dung dịch được làm nay hơi đến khô rồi cho một lượng xác định chất rửa giải vào cặn và kiểm tra bằng HPLC với detector UV ở bước sóng 220 nm.

Việc nhận biết các chất được thực hiện bằng cách so sánh thời gian lưu tương ứng của mẫu với thời gian lưu của chất chuẩn liên quan. Sau đó, tiến hành định lượng theo phương pháp chuẩn ngoại, sử dụng các diện tích pic.

5 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng các loại thuốc thử loại phân tích. Nước được sử dụng phải phù hợp với loại 1 trong TCVN 4851 (ISO 3696).

5.1 *Tert*-butyl methyl ete (tBME), phù hợp với HPLC.

5.2 Axetonitril (C_2H_3N), phù hợp với HPLC.

5.3 Metanol (CH_3OH), độ tinh khiết 96 %.

5.4 Diclorometan (CH_2Cl_2), loại dùng cho phân tích.

5.5 Natri L (+) ascorbat

5.6 Natri clorua (NaCl), 2 % và 10 %, loại dùng cho phân tích.

5.7 Natri sulfat (Na_2SO_4), khan

Nung natri sulfat ở 550 °C trong 12 h, sau khi làm nguội trong bình hút ẩm, nghiền trong cối và bảo quản trong bình tối màu đặt trong tủ hút ẩm.

5.8 Hạt trợ sôi

5.9 Kali hydroxit (KOH), dạng viên, loại dùng cho phân tích.

5.10 Dung dịch kali hydroxit trong etanol

Hoà tan 100 g kali hydroxit (5.9) trong 100 ml nước và thêm etanol đến 1 000 ml.

5.11 Pha động

Trộn đều 60 phần thể tích axetonitril (5.2) và 40 phần thể tích nước.

5.12 Dung dịch chuẩn 16-O-metylcafestol

5.12.1 Dung dịch chuẩn gốc

Cân khoảng 10 mg 16-O-metylcafestol (5.12) cho vào bình định mức 100 ml (khoảng 100 µg/ml). Hòa tan trong pha động (5.11), sử dụng bể siêu âm, sau đó thêm pha động (5.12) đến vạch.

Dung dịch chuẩn gốc bền trong ít nhất 12 tuần khi được bảo quản trong tủ lạnh

5.12.2 Dung dịch chuẩn làm việc

Pha loãng dung dịch gốc (5.12.1), để tạo được dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 16-O-metylcafestol gần với nồng độ của dung dịch thử.

Các dung dịch chuẩn làm việc (nồng độ khoảng 10 g/ml đến và 50 g/ml) bền trong ít nhất 3 tuần khi được bảo quản trong tủ lạnh hoặc bảo quản ở nhiệt độ phòng (20 °C, không có ánh sáng trực tiếp).

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm và cụ thể như sau:

6.1 Máy xay cà phê, thích hợp để xay hạt cà phê rang hoặc máy xay thông dụng phù hợp

6.2 Sàng, cỡ lỗ 0,25 mm và 0,63 mm, đáp ứng các yêu cầu của ISO 3310-1.

6.3 Cối và chày

6.4 Ống chiết

6.5 Thiết bị chiết Soxhlet

6.6 Bình cầu đáy tròn, dung tích 250 ml

6.7 Thiết bị cô quay chân không

6.8 Bể siêu âm

6.9 Nồi cách thủy, có thể kiểm soát được nhiệt độ 80 °C và 90 °C.

6.10 Bình hồi lưu

6.11 Phễu chiết, dung tích 500 ml

6.12 Giấy lọc gấp nếp, đường kính 150 mm

6.13 Lọ nhỏ (vial), trong suốt hoặc màu hổ phách, dung tích 4 ml

6.14 Dụng cụ gia nhiệt để làm bay hơi dung môi

6.15 Màng lọc, cỡ lỗ 0,2 μ m

6.16 Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector UV, để đo ở bước sóng 220 nm và có hệ thống thu nhận xử lý dữ liệu.

6.17 Cột sắc ký, chứa pha đảo C18, kích thước 250 mm x 4 mm và được nhồi các hạt silica gel, cỡ hạt từ 3 μ m đến 7 μ m.

6.18 Bình định mức, dung tích 50 ml

7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên có liên quan nên thỏa thuận với nhau về vấn đề này.

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị mẫu

Xay cà phê rang bằng máy xay cà phê (6.1) sau đó sàng qua sàng cỡ lỗ 0,25 mm và 0,63 mm (6.2) sao cho tối thiểu là 30 % phần hạt lọt qua sàng cỡ lỗ 0,25 mm và tối đa 50 % phần hạt được giữ lại trên sàng 0,63 mm. Sử dụng mẫu ở giữa hai sàng cho phép xác định.

Cà phê rang xay bán trên thị trường không đáp ứng các yêu cầu này phải được xay lại.

8.2 Tách các thành phần không xà phòng hoá

8.2.1 Chiết chất béo

Cân 5 g mẫu đã chuẩn bị (8.1) chính xác đến 0,01 g, nghiền cùng với 20 g natri sulfat (5.7) trong cối

(6.3) và chiết bằng tBME (5.1) trong 5 h, dùng thiết bị chiết Soxhlet (6.5) [trong nồi cách thủy ở 80 °C (6.9), thực hiện bốn chu trình chiết mỗi giờ]. Dùng chiết khi phần lớn dung môi vẫn còn trong thiết bị Soxhlet (6.5). Loại phần lớn dung môi trên thiết bị cô quay chân không (6.7). Chuyển dung dịch còn lại trong bình cầu đáy tròn sang bình định mức 50 ml (6.18), tráng bình bằng tBME (5.1) và xử lý dung dịch bằng siêu âm (6.8) trong 1 min. Sau đó, bổ sung tBME (5.1) đến khoảng 45 ml.

8.2.2 Xà phòng hoá chất béo của cà phê

Cho dung dịch thu được trong 8.2.1 vào bể siêu âm lạnh trong vài phút, sau đó bổ sung tBME (5.1) đến vạch để thu được dung dịch chất béo.

Chuyển 20 ml dung dịch chất béo này vào bình cầu đáy tròn dung tích 250 ml (6.6), làm bay hơi tBME bằng thiết bị cô quay chân không (6.7). Thêm vài hạt trợ sôi (5.8) và một thìa natri L (+) ascorbat (5.5), xà phòng hoá bằng 40 ml dung dịch kali hydroxit (5.10) có đun hồi lưu trong nồi cách thủy ở 90 °C (6.9) trong 2 h. Làm bay hơi thể tích ancol còn từ 2 ml đến 3 ml, sử dụng thiết bị cô quay chân không (6.7).

Chuyển từ từ dung dịch vào phễu chiết 500 ml (6.11), thêm nước nóng ở khoảng 70 °C đến 80 ml. Tráng bình bằng 25 ml metanol (5.3).

Sau đó, thêm 20 ml dung dịch natri clorua 10 % (5.6) [có thể bổ sung 50 ml metanol (5.3) để tách pha nhanh hơn]. Trong quá trình chiết, nhiệt độ phòng không được vượt quá 22 °C. Lắc hỗn hợp hai lần, mỗi lần dùng 100 ml tBME (5.1) trong 3 min, có thể để yên qua đêm sau lần chiết thứ nhất nhằm tách pha. Đảm bảo rằng tách pha hoàn toàn; thêm vài mililit metanol (5.3), nếu cần. Gộp dịch chiết lần đầu vào pha nước và dịch chiết lần thứ hai vào pha ete.

Dịch chiết ete được rửa bằng 100 ml dung dịch natri clorua 2 % (5.6). Sau khi các pha phân tách, pha phía trên đã trong, cho toàn bộ pha ete vào bình cầu đáy tròn dung tích 250 ml chứa 7,5 g natri sunfat (5.11), tráng phễu chiết bằng 10 ml tBME (5.1). Sau khi lắc cẩn thận, dung môi kết hợp được làm khô bằng natri sunfat (5.7) trong 15 min. Sau đó, gạn cẩn thận dung dịch ete nổi phía trên vào bình cầu đáy tròn dung tích 250 ml (6.6) khác. Dung môi còn lại được chảy qua giấy lọc gấp nếp (6.12) có natri sunfat (5.7). Rửa bình có natri sunfat còn lại hai lần, mỗi lần 10 ml tBME (5.1) sau đó chuyển dung dịch lên giấy lọc gấp nếp (6.12). Làm bay hơi dung dịch ete đến khô trên thiết bị cô quay chân không (6.7).

8.3 Chuẩn bị dung dịch thử

Hoà tan dịch thu được (8.2.2) với khoảng 10 ml diclorometan (5.4) trong bể siêu âm (6.8), sau đó chuyển hết dung dịch vào bình định mức 20 ml có bổ sung diclorometan (5.4) đến vạch. Dùng pipet lấy 2 ml dung dịch cho vào vial 4 ml (6.13) và cô đặc cẩn thận đến khô dưới dòng nitơ. Cho 2 ml pha động (5.12) [(hoặc cách khác, trong 2 ml axetonitril (5.2)] vào phần cặn còn lại và đặt ngay vào bể siêu âm (6.8). Nếu dung dịch đục, lọc qua màng lọc (6.15).

Dung dịch bền trong khoảng 26 ngày khi được bảo quản nơi tối, ở nhiệt độ phòng. Cần tránh ánh sáng mạnh hoặc tia UV.

8.4 Xác định

Các thông số sau đây cho thấy phù hợp với cột được quy định trong 6.17

Pha động: tỷ lệ axetonitril:nước, 60:40 (5.12)

Cột sắc ký: xem 6.17

Thể tích bơm: 20 µl

Tốc độ dòng: 1 ml/min

Bước sóng: 220 nm

Đường chuẩn được xây dựng bằng đa điểm chuẩn để đảm bảo độ tuyến tính.

Hàm lượng 16-O-methylcafestol phải được xác định từ diện tích pic bằng phương pháp chuẩn ngoại.

9 Tính kết quả

Hàm lượng 16-O-methylcafestol, W_m , tính theo phần khối lượng, biểu thị bằng mg/kg, được tính theo công thức (1):

$$W_M = \frac{A_x \times c \times V_1 \times V_3}{A_M \times m_E \times V_2} = \frac{A_x \times c \times 50}{A_M \times m_E} \tag{1}$$

Trong đó

- A_x là diện tích của pic 16-O-methylcafestol khi đo dung dịch thử, tính bằng đơn vị diện tích;
- c là nồng độ của dung dịch chuẩn 16-O-methylcafestol, tính bằng microgam trên mililit (µg/ml);
- A_M là diện tích của pic 16-O-methylcafestol khi đo dung dịch chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích;
- m_E là khối lượng của mẫu ban đầu, tính bằng gam (g);
- V_1 là thể tích của dung dịch chất béo được xác định trong 8.2.1 (50 ml);
- V_2 là thể tích dung dịch chất béo đã xà phòng hoá được xác định trong 8.2.2 (20 ml);
- V_3 là thể tích dung dịch diclorometan được xác định trong 8.2.3 (20 ml).

10 Độ chụm

10.1 Yêu cầu chung

Độ chụm của phương pháp được xác định trong phép thử liên phòng gồm 8 phòng thử nghiệm tham gia. Các kết quả được nêu trong Phụ lục A. Việc đánh giá được thực hiện theo ISO 5725:1986¹.

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập, đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong cùng một khoảng thời gian ngắn, không được lớn hơn giới hạn lặp lại r nêu trong Bảng A.1.

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn giá trị giới hạn tái lập R nêu trong Bảng A.1

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau đây:

- a) loại mẫu và nguồn gốc của mẫu;
- b) phương pháp lấy mẫu;
- c) ngày thử nghiệm;
- d) hàm lượng 16-O-methylcafestol của cà phê rang tính bằng miligam trên kilogam;
- e) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.

¹ ISO 5725:1986 (hiện nay đã huỷ) được sử dụng để thu lấy dữ liệu về độ chụm.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

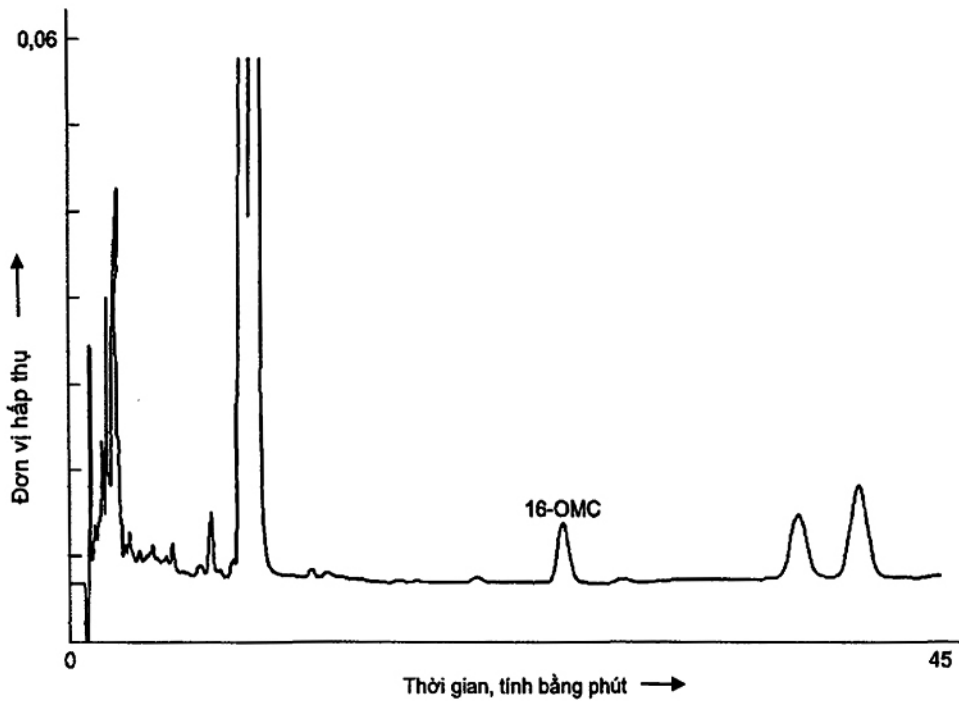
Các mẫu được thử nghiệm trong phép thử so sánh liên phòng thử nghiệm là hỗn hợp rang xay của cà phê Arabica và cà phê Robusta (chứa tương ứng 20 % và 10 % robusta). Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được nêu trong Bảng A.1

Bảng A.1 – Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

	Mẫu A ^a	Mẫu B ^a
Số lượng phòng thử nghiệm	8	8
Giá trị trung bình (mg/kg)	257,6	130,1
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	11,7	5,9
Độ lệch chuẩn tái lập, S_R	29,9	12,8
Giới hạn lặp lại, r	33,0	16,7
Giới hạn tái lập, R	84,6	36,1
^{a)} Các giá trị được nêu ra ở đây chỉ hợp lệ đối với các mẫu thử nghiệm liên phòng.		

Phụ lục B

(Tham khảo)

Ví dụ về sắc ký đồ điển hình

Các thông số của máy sắc ký lỏng hiệu năng cao

Cột sắc ký:	xem 6.17
Pha động:	tỷ lệ axetonitril:nước, 60:40 (5.12)
Thể tích bơm:	20 μ l
Tốc độ dòng:	1 ml/min
Bước sóng:	220 nm

**Hình B.1 – Sắc ký đồ điển hình của mẫu cà phê rang
có hàm lượng 16-O-methylcafestol 146 mg/kg**

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ISO 5725:1986, *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests*
-