

UŻYWKI	N O R M A B R A N Ż O W A WYMAGANIA IMPORTOWE	BN-80
	Kawa	8136-13
	Oznaczanie kofeiny	
	Oznaczanie zawartości wody w ekstraktach kawy naturalnej	Grupa katalogowa 1256

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest metoda oznaczania zawartości kofeiny w kawie wg zmodyfikowanej metody Levina, jako metoda rutynowa i odwoławcza oraz metoda oznaczania zawartości wody w ekstraktach kawy naturalnej, w suszarce próżniowej.

1.2. Zakres stosowania normy. Normę stosuje się do oznaczania zawartości kofeiny w kawie surowej, kawie palonej, ekstraktach kawy naturalnej suchych i płynnych oraz w tych samych produktach odkofeinowanych i do oznaczania zawartości wody w ekstraktach kawy naturalnej w imporcie.

1.3. Określenia. Kofeina — główny alkaloid purynowy nasion krzewu kawowego otrzymywany metodą ekstrakcji rozpuszczalnikami, w warunkach określonych metodą.

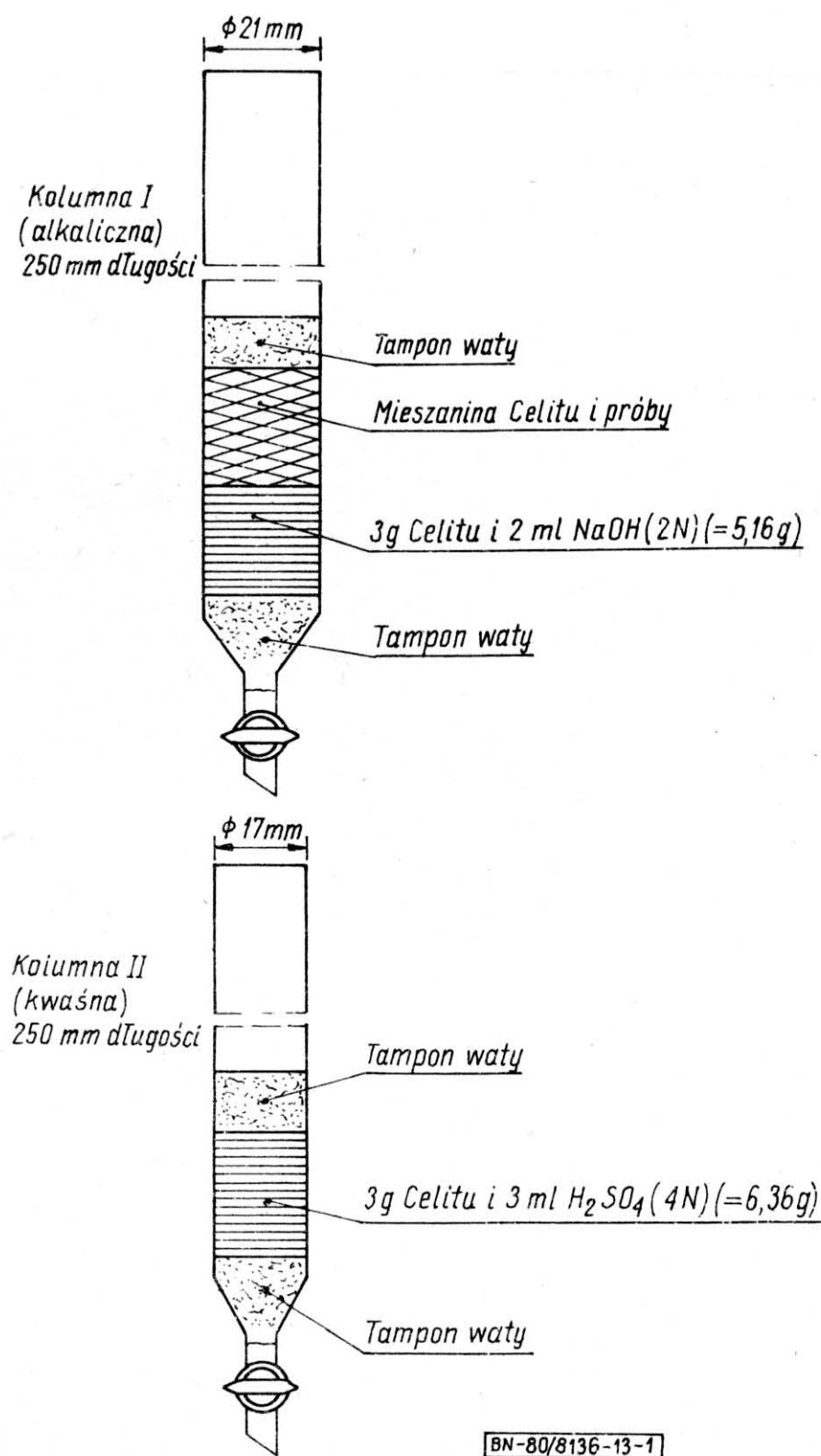
2. METODY OZNACZANIA

2.1. Oznaczanie zawartości kofeiny

2.1.1. Zasada oznaczania polega na ekstrakcji kofeiny z próbki w środowisku amoniakalnym, stopniowym rozdziale metodą chromatografii kolumnowej przy użyciu eteru etylowego, a następnie eluowaniu chloroformem i pomiarze absorbancji eluatu w zakresie światła ultrafioletowego.

2.1.2. Aparaty i przyrządy

a) Kolumny chromatograficzne (rys. 1), szklane z kurkiem z przelotem prostym o wymiarach:
długość — 250 mm,
średnice wewnętrzne — 21 mm (kolumna I),
średnice wewnętrzne — 17 mm (kolumna II).



Rys. 1. Kolumny chromatograficzne

Zgłoszona przez Ministerstwo Handlu Zagranicznego i Gospodarki Morskiej Centralny Inspektorat Standaryzacji
Ustanowiona przez Dyrektora Centralnego Inspektoratu Standaryzacji dnia 4 września 1980 r.

Zarządzeniem nr 273/M80

jako norma obowiązująca od dnia 1 kwietnia 1981 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 23/1980 poz. 94)

b) Spektrofotometr do pomiaru w zakresie światła UV, z dokładnością odczytu absorbancji do 0,004 — dla metody odwoławczej.

c) Kuwety kwarcowe o długości drogi światła 10 mm

d) Łaźnia wodna.

e) Waga analityczna.

f) Młynek wykonany z materiału nie absorbującego wilgoci, o małej powierzchni martwej, szybkoobrotowy (około 15 000 obr/min), np. młynek do kawy.

g) Sita o oczkach kwadratowych 0,6 lub 0,63 mm.

2.1.3. Odczynniki

a) Kwas siarkowy cz.d.a., roztwór 4N.

b) Wodorotlenek sodowy cz.d.a., roztwór 2N.

c) Celit 545 do chromatografii lub równoważny, np. Hyflo-super-cel.

d) Amoniak cz.d.a., roztwór około 4N: 1 objętość stężonego amoniaku (25-procentowego) zmieszać z 2 objętościami wody destylowanej.

e) Eter etylowy cz. lub po analizie oczyszczony na kolumnie chromatograficznej wypełnionej zasadowym tlenkiem glinu o stopniu aktywności I. W tym celu przepuścić 800 cm³ eteru etylowego przez kolumnę wypełnioną 100 g tlenku glinu. Tak oczyszczony eter etylowy wysycony wodą przechowywać w ciemnej butelce.

Równocześnie można użyć świeżo przedestylowany eter etylowy wysycony wodą destylowaną. W przypadku użycia rozpuszczalników oczyszczonych, sprawdzić ich czystość wykonując ślepą próbę.

f) Chloroform cz. lub oczyszczony wg 2.1.3 e).

g) Kofeina (1,3,7-trójmetylo-2,6-dwuoksypuryna) cz. bezwodna (C₈H₁₀N₄O₂).

h) Wata bawełniana lub szklana.

2.1.4. Pobieranie i przygotowanie próbki do analizy

2.1.4.1. Pobieranie próbki dla:

— kawy surowej — wykonać wg BN-76/8136-06,

— kawy palonej — wykonać wg BN-62/8136-02,

— ekstraktu kawy naturalnej — wykonać wg PN-76/A-94010.

2.1.4.2. Przygotowanie próbki do analizy. Rozdrobnić na młynku (2.1.2 f) część średniej próbki laboratoryjnej kawy surowej lub palonej otrzymanej wg 2.1.4.1, tak aby próbka po zmieleniu przechodziła w całości przez sito o oczkach kwadratowych 0,6 lub 0,63 mm. Część tak przygotowanej próbki może być wykorzystana do oznaczania zawartości suchej masy. Przygotowanie próbki ekstraktu kawy naturalnej wykonać wg BN-79/8133-03, p. 2.3.5.1.

2.1.5. Przygotowanie odważki

2.1.5.1. Kawa surowa i palona. Odważyć około 1 g rozdrobnionej próbki (2.1.4.2), z dokładnością do 0,0001 g, do zlewki pojemności 100 cm³, dodać 5 cm³ roztworu amoniaku (2.1.3 d) i ogrzewać 2 min na wrzącej łaźni wodnej. Pozostawić zlewkę do schłodzenia, następnie przenieść ilościowo jej zawartość do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³, uzupełniając zawartość do kreski wodą destylowaną i całość dobrze wymieszać.

Pozostawić otrzymaną zawiesinę do sklarowania. Pobrać pipetą 5 cm³ sklarowanego roztworu do zlewki

pojemności 100 cm³, dodać 6 g Celitu 545 i starannie wymieszać.

2.1.5.2. Kawa surowa i kawa palona — odkofeinowana. Odważyć około 1 g rozdrobnionej próbki (2.1.4.2) z dokładnością do 0,0001 g do zlewki pojemności 100 cm³, dodać 5 cm³ roztworu amoniaku (2.1.3 d) i ogrzewać 2 min na wrzącej łaźni wodnej. Następnie dodać 6 g Celitu 545 i starannie wymieszać.

2.1.5.3. Ekstrakt kawy naturalnej — suchy. Postępować jak w 2.1.5.1 przy użyciu odważki 0,5 g i odpowiednio pobrać 2 cm³ zawiesiny i 3 g Celitu 545.

2.1.5.4. Ekstrakt kawy naturalnej — płynny. Postępować jak w 2.1.5.1 przy użyciu odważki 1,0 ÷ 2,5 g, zawierającej około 0,5 g suchego ekstraktu kawy naturalnej w przeliczeniu na substancję stałą i odpowiednio pobrać 2 cm³ zawiesiny i 3 g Celitu 545.

2.1.5.5. Ekstrakt kawy naturalnej — płynny, odkofeinowany. Postępować jak w 2.1.5.2 przy użyciu odważki 1,0 ÷ 2,5 g, zawierającej około 0,5 g suchego ekstraktu kawy naturalnej w przeliczeniu na substancję stałą i 7,0 ÷ 8,0 g Celitu 545.

2.1.6. Wykonanie oznaczania

2.1.6.1. Wypełnianie kolumn

a) Kolumna alkaliczna — I.

Warstwa A. Odważkę 3 g Celitu 545 wymieszać starannie w zlewce z 2 cm³ roztworu wodorotlenku sodu (2.1.3 b) w celu otrzymania jednorodnego, wilgotnego proszku. Przenosić porcjami wymieszany proszek na kolumnę (2.1.2 a) rys. 1) uprzednio upakowaną tamponem waty (2.1.3 h) i ubijać każdorazowo dodaną porcję precikiem szklanym o spłaszczonym końcu dopasowanym do średnicy kolumny. Przykryć warstwę proszku tamponem waty i mocno ubić.

Warstwa B. Przenieść ze zlewki mieszaninę Celitu 545 i próbki, przygotowaną wg 2.5 na szczyt warstwy A kolumny alkalicznej. Osuszyć zlewkę dwiema porcjami po 1 g Celitu 545 i nanieść na kolumnę każdorazowo ubijając dodaną porcję proszku. Zamknąć szczyt kolumny tamponem waty i mocno ubić.

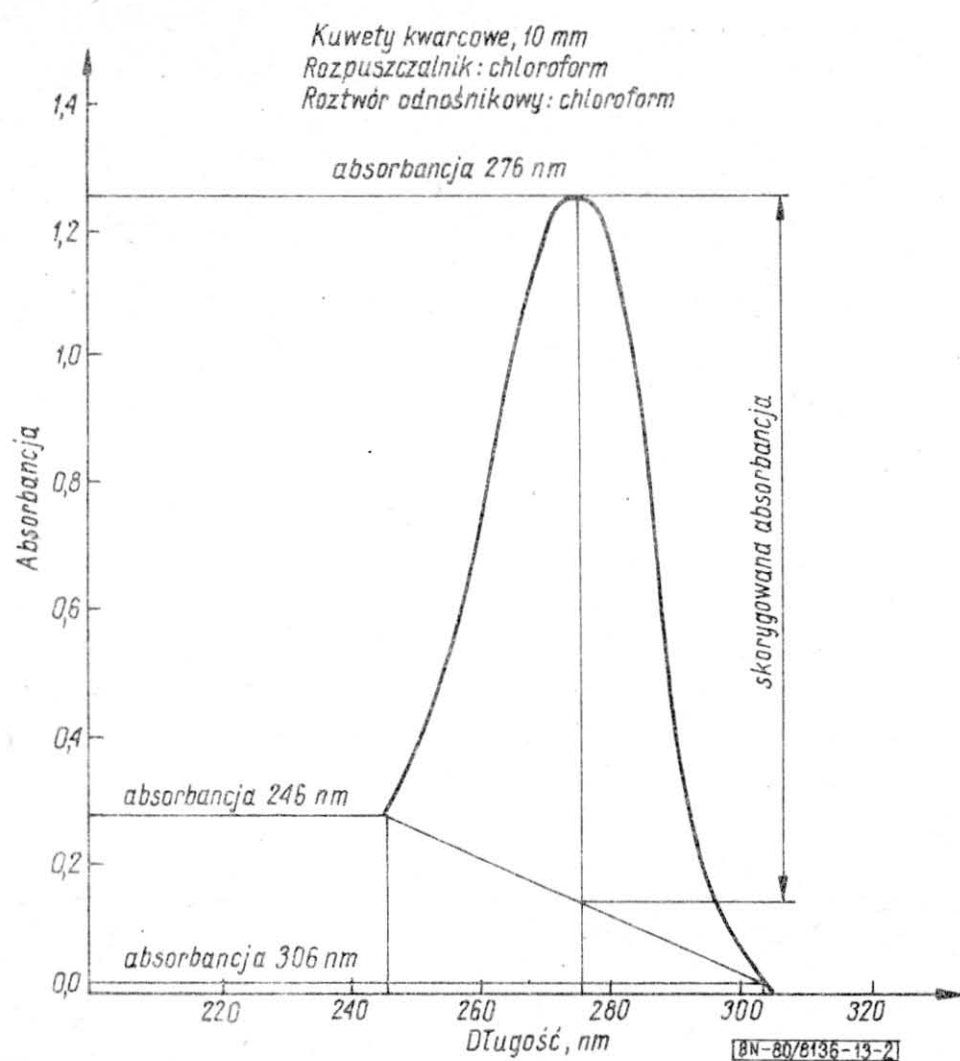
Prawidłowo przygotowana kolumna powinna być ściśle upakowana, bez przerw między kolejno dodawanymi porcjami wypełniania.

b) Kolumna kwaśna — II. Umieścić w dole kolumny tampon waty i mocno ubić, następnie nanosić porcjami dokładnie wymieszaną odważkę 3 g Celitu 545 z 3 cm³ roztworu kwasu siarkowego (2.3 a) i postępować dalej jak w 2.6.1 — warstwa A.

2.1.6.2. Rozdział chromatograficzny. Umocować kolumny na statywie tak, aby eluat z kolumny I mógł spływać bezpośrednio do kolumny II. Przepuścić przez obie kolumny 150 cm³ eteru etylowego (2.1.3 e), regulując szybkość przepływu, tak aby nad szczytem kolumny II pozostawała zawsze warstwa eluatu z kolumny I. Zdjąć kolumnę I i przemyć jej końcówkę 50 cm³ eteru etylowego, nanosząc go następnie na kolumnę II. Odrzucić cały eluat otrzymany po wymywaniu kolumn eterem etylowym, który może być oczyszczony przez wytrząsanie z siarczanem żelazawym i przepuszczony przez kolumnę chromatograficzną. Następnie otworzyć całkowicie kurek kolumny II i przed-

muchiwać jej zawartość od góry strumieniem powietrza do zaniku zapachu eteru etylowego na wylocie kolumny. Operację powyższą należy przeprowadzać pod wyciągiem w celu uniknięcia możliwości wybuchu nagromadzonych par rozpuszczalnika. Następnie nanieść na osuszoną kolumnę II 45÷50 cm³ chloroformu (2.3 f) i zbierać eluat do kolby pomiarowej pojemności 50 cm³, uzupełnić zawartość do kreski chloroformem i dobrze wymieszać. W ciągu całego procesu chromatografowania ustalić szybkość przepływu eteru etylowego i chloroformu na poziomie 1,5÷3 cm³/min. Wykonać dwa równoległe oznaczania z tej samej próbki.

2.1.6.3. Pomiar spektrofotometryczny (rys. 2)



Rys. 2. Pomiar spektrofotometryczny

a) Pomiar absorbancji roztworu badanej próbki. Wykonać pomiar absorbancji chloroformowego roztworu kofeiny w kuwetach kwarcowych wobec chloroformu jako roztworu odnośnikowego przy następujących długościach fal — 276 nm (maksimum absorbancji), 246 nm (minimum absorbcji) i 306 nm (kontrola czystości otrzymanej kofeiny).

Jeżeli odczyt absorbancji przy 276 nm długości fali przekracza wartość 1,3, powtórzyć pomiar na rozcieńczonym roztworze badanej próbki, uwzględniając współczynnik rozcieńczenia przy obliczaniu wyników (p. 2.1.6.4). Jeżeli odczyt absorbancji przy 276 nm długości fali jest niższy niż 0,2 — powtórzyć całe oznaczanie biorąc większą naważkę.

b) Przygotowanie i pomiar absorbancji roztworu wzorcowego. Odważyć z dokładnością do około 0,0001 g 100 ±20 mg kofeiny (2.3 g), przenieść do kolby po-

miarowej pojemności 1000 cm³, rozpuścić w chloroformie i uzupełnić do kreski, a następnie dokładnie wymieszać (roztwór A). Pobrać pipetą 5 cm³ otrzymanego roztworu (A) do kolby pomiarowej pojemności 50 cm³, uzupełnić chloroformem do kreski i dokładnie wymieszać (roztwór B). Wykonać pomiar absorbancji otrzymanego roztworu wzorcowego (roztwór B) wg 2.1.6.3 a). Skorygowana wartość absorbancji roztworu B powinna wynosić około 0,4.

Wykonać dwa równoległe oznaczania z tej samej próbki.

2.1.6.4. Obliczanie wyników. Zawartość kofeiny (X_1) w kawie surowej i palonej wyrażoną w procentach wagowo w przeliczeniu na suchą masę obliczyć wg wzoru

$$X_1 = \frac{50 \cdot 10^6 \cdot C \cdot A_1}{5 \cdot A_2 \cdot m \cdot P} \quad (1)$$

w którym:

C — stężenie roztworu wzorcowego kofeiny (B), g/cm³

A_1 — skorygowana wartość absorbancji ekstraktu (2.1.6.2) otrzymanego wg 2.1.6.3 a) obliczona wg wzoru

$$[(A_{276\text{nm}} - 0,5(A_{246\text{nm}} + A_{306\text{nm}}))]$$

A_2 — skorygowana wartość absorbancji roztworu wzorcowego kofeiny (B) p. 2.1.6.3 b) obliczona wg wzoru

$$[(A_{276\text{nm}} - 0,5(A_{246\text{nm}} + A_{306\text{nm}}))]$$

m — masa odważki, g,

P — procent wagowo zawartości suchej masy w próbce oznaczony wg BN-62/8136-02, BN-77/8136-09 lub p. 2.2 odpowiednio dla badanego produktu

Zawartość kofeiny (X_2) w kawie surowej, kawie palonej i ekstrakcie kawy naturalnej, odkofeinowanych, wyrażoną w procentach wagowych w przeliczeniu na suchą masę obliczyć wg wzoru

$$X_2 = \frac{5 \cdot 10^5 \cdot C \cdot A_1}{A_2 \cdot m \cdot P} \quad (2)$$

w którym: C , A_1 , A_2 , m , P — jak we wzorze (1).

Zawartość kofeiny (X_3) w ekstrakcie kawy naturalnej suchym i płynnym, wyrażoną w procentach wagowo w przeliczeniu na suchą masę obliczyć wg wzoru

$$X_3 = \frac{25 \cdot 10^6 \cdot C \cdot A_1}{A_2 \cdot m \cdot P} \quad (3)$$

w którym: C , A_1 , A_2 , m , P — jak we wzorze (1).

Za wynik przyjąć średnią arytmetyczną dwóch równoległych oznaczeń, różniących się nie więcej niż o wartości podane w tablicy powtarzalności i odtwarzalności metody.

2.1.6.5. Odtwarzalność metody. Dopuszcza się różnicę między dwoma niezależnymi oznaczaniami, wykonanymi w dwóch różnych laboratoriach, na tej samej próbce, nie przekraczające wartości podanych w tablicy powtarzalności i odtwarzalności metody.

Powtarzalności i odtwarzalności metody

Próbka	Ilość kofeiny g/100 g kawy	Metoda rutynowa		Metoda odwoławcza	
		powtarzalność g kofeiny/100 g kawy	odtworzalność g kofeiny/100 g kawy	powtarzalność g kofeiny/100 g kawy	odtworzalność g kofeiny/100 g kawy
Kawa surowa	około 2	0,3	0,4	0,12	0,38
	około 1	0,2	0,3	0,08	0,31
	odkofeinowana <0,1	0,02	0,02	<0,01	0,01
Kawa palona	około 2	0,2	0,3	0,10	0,32
	około 1	0,1	0,2	0,04	0,19
	odkofeinowana <0,1	0,01	0,01	<0,01	0,01
Ekstrakt kawy naturalnej	około 4	0,4	0,6	0,17	0,39
	około 2	0,2	0,3	0,12	0,20
	odkofeinowany <0,3	0,01	0,01	0,01	0,01
Poziom ufności — 0,05. Wynik podać z dokładnością do drugiego miejsca dziesiętnego.					

2.1.6.6. Wykrywalność metody. Najniższy poziom wykrywalności metody wynosi 0,02% kofeiny w przeliczeniu na suchą masę.

2.2. Oznaczanie zawartości wody w ekstraktach kawy naturalnej

2.2.1. Zasada oznaczania polega na suszeniu próbki ekstraktu kawy naturalnej do stałej masy w suszarce próżniowej (50 mbar max.), w temperaturze 70°C przez 16 h, w obecności środka suszącego.

2.2.2. Aparaty i przyrządy.

a) Naczynka wagowe o średnicy minimum 50 mm i wysokości 25÷30 mm, z dobrze dopasowanymi przykrywkami.

b) Waga analityczna.

c) Suszarka próżniowa izotermiczna, z termoregulacją w zakresie 70 ±1°C.

d) Pompa próżniowa redukująca ciśnienie w suszarce do 50 mbar max.

e) Eksykator z efektywnym środkiem suszącym, np. pięciotlenek fosforu.

2.2.3. Odczynniki.

Pięciotlenek fosforu cz.

2.2.4. Pobieranie i przygotowanie próbki do analizy

— wg 2.1.4.1 i 2.1.4.2.

2.2.5. Wykonanie oznaczania. Z przygotowanej próbki wg 2.2.4 pobrać do naczynka uprzednio wysuszonego w temperaturze 70°C do stałej masy, 2÷3 g odważki i równomiernie rozsypać na dnie naczynka. Przykryć przykrywką i zważyć z dokładnością do 0,0001 g. W przypadku sporządzania serii odważek, umieszczać kolejno przygotowane odważki w eksykatorze. Wszystkie operacje związane z przygotowaniem odważek wykonywać tak szybko, jak to jest możliwe, z uwagi

na dużą higroskopijność badanego produktu. Naczynko z przygotowaną odważką umieścić w suszarce, zdjąć przykrywkę. Jednocześnie włożyć do suszarki płytę Petriego wypełnioną pięciotlenkiem fosforu. Zamknąć suszarkę, obniżyć ciśnienie do 50 mbar max i suszyć w temperaturze 70 ±1°C przez 16 h ±30 min. Następnie wyjąć naczynko, przykryć przykrywką i zważyć po ostudzeniu z dokładnością do 0,0001 g. Wykonać dwa równoległe oznaczania z tej samej próbki.

2.2.6. Obliczanie wyników. Zawartość wody (Y) wyrażoną w procentach wagowo obliczyć wg wzoru

$$Y = \frac{m_1 - m_2 \cdot 100}{m_1 - m_0} \quad (4)$$

w którym:

m_0 — masa pustego naczynka, g,

m_1 — masa naczynka z odważką przed suszeniem, g,

m_2 — masa naczynka z odważką po suszeniu, g.

Za wynik przyjąć średnią arytmetyczną dwóch równoległych oznaczeń różniących się nie więcej niż 0,05% wartości bezwzględnej. Wynik podać z dokładnością do drugiego miejsca dziesiętnego.

2.2.7. Odtwarzalność metody. Różnica między dwoma równoległymi oznaczaniami, wykonanymi w dwóch różnych laboratoriach na tej samej próbce nie powinna przekraczać 0,1% wartości bezwzględnej.

2.3. Protokół badań. W protokole należy podać zastosowaną metodę i otrzymany wynik, jak również ujmować wszystkie szczegóły wykonania badania nie ujęte w normie lub uważane za dowolne oraz wszystkie okoliczności mogące mieć wpływ na wynik. Protokół badań powinien obejmować wszystkie dane konieczne do pełnej identyfikacji próbki.

K O N I E C

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Ministerstwo Handlu Zagranicznego i Gospodarki Morskiej — Centralny Inspektorat Standaryzacji, Warszawa.

2. Normy związane

PN-76/A-94010 Ekstrakt kawy naturalnej. Marago

BN-79/8133-03 Koncentraty ciast, deserów, napojów i przypraw do ciast. Pobieranie próbek i metody badań

BN-63/8136-02 Użytki i przyprawy. Kawa naturalna palona

BN-76/8136-06 Kawa surowa. Pobieranie próbek

BN-77/8136-09 Kawa surowa. Oznaczanie wilgotności. Metoda praktyczna

3. Normy międzynarodowe

ISO Draft International Standard 3726 Instant coffee — Determination of moisture content (Routine vacuum oven method)

ISO Draft International Standard 4052 Coffee — Determination of caffeine content — Modified Levine method.

4. Autor projektu normy — mgr Anna Priss — Centralny Inspektorat Standaryzacji, Warszawa.