ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 52613— 2006 (ИСО 10095:1992)

КОФЕ

Определение массовой доли кофеина Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

ISO 10095:1992
Coffee — Determination of caffeine content — Method using high-performance liquid chromatography
(MOD)

Издание официальное

БЗ 11—2006/306

Москва
Стандартинформ
2007

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 Государственным научным учреждением «Научно-исследовательский институт пищеконцентратной промышленности и специальной пищевой технологии» Россельхозакадемии (ГНУ «НИИПП и СПТ» Россельхозакадемии) на основе аутентичного перевода стандарта, указанного в пункте 4, который выполнен ФГУП «Стандартинформ»

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 152 «Пищевые концентраты, натуральные ароматизаторы и красители»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 декабря 2006 г. № 307-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 10095:1992 «Кофе. Определение массовой доли кофеина. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии» (ISO 10095:1992 «Coffee — Determination of caffeine content — Method using high-performance liquid chromatography, MOD»). При этом дополнительные положения и требования, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделены в тексте стандарта курсивом

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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 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, 2007

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 2
5 Средства измерений и оборудование 2
6 Отбор проб 3
7 Подготовка анализируемой пробы 3
8 Методика проведения анализа 3
9 Обработка результатов измерений 5
10 Требования к точности результатов измерений 6
11 Протокол испытаний 6
Библиография 7

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОФЕ

Определение массовой доли кофеина. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

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

Дата введения — 2008—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения массовой доли кофеина с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ) в обычном и декофеинизированном зеленом (сыром) и жареном кофе, а также в обычном и декофеинизированном растворимом кофе.

Примечание — Эталонный метод определения содержания кофеина с применением ультрафиолетовой абсорбционной спектрофотометрии приведен в международном стандарте ИСО 4052 *[1]*.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения (ИСО 5725-1:1994, 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 (ИСО 5725-1:1994, IDT)

ГОСТ Р 52612—2006 (ИСО 3726:1983) Кофе растворимый. Определение массовой доли влаги при температуре 70 °С и пониженном давлении (ИСО 3726:1983 «Кофе растворимый. Определение потери массы при температуре 70 °С и пониженном давлении», MOD)

ГОСТ 15113.0—77 Концентраты пищевые. Правила приемки, отбор и подготовка проб

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Метод основан на экстрагировании кофеина из испытуемой пробы с применением воды при температуре 90 °С в присутствии оксида магния, фильтрации и последующей очистке пробы на микроколонке, заполненной силикагелем, модифицированным фенильными группами.

Определение массовой доли кофеина проводят методом ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием.

Издание официальное

4 Реактивы

Следует применять реактивы удостоверяемого аналитического качества, если иное не указано, дистиллированную или деминерализованную воду, либо воду эквивалентной чистоты.

4.1 Метанол класса для ВЭЖХ.

4.2 Раствор аммиака (0,3 моль/дм^3)/метанол, смесь в соотношении 90:10 по объему.

4.3 Элюентный раствор для очистки колонки — метанол/вода/уксусная кислота, смесь в соотношении 75:25:1 по объему.

4.4 Мобильная фаза — метанол/вода, смесь в соотношении 30:70 по объему.

Наливают 600 см^3 метанола (4.1) в мерную колбу с одной отметкой вместимостью 2 дм^3 и добавляют воду до метки. Перемешивают и затем фильтруют смесь через фильтр с размером пор 0,45 мкм (5.7).

Примечание — При подборе нужной концентрации метанола время удерживания кофеина может быть модифицировано так, чтобы оптимизировать отделение его методом ВЭЖХ.

4.5 Этанол/вода, раствор в соотношении 1:4 по объему.

4.6 Оксид магния* с содержанием основного вещества не менее 98 %.

4.7 Кофеин, исходный раствор массовой концентрации 0,5 г/дм^3.

Взвешивают 125 мг кофеина с точностью до 0,1 мг и помещают в мерную колбу вместимостью 250 см^3, выполненную из стекла.

Добавляют раствор этанол/вода (4.5) до половины колбы. Растворяют кофеин и затем доливают до метки тот же раствор этанол/вода.

Этот раствор можно хранить в холодильнике в течение месяца.

4.8 Кофеин, стандартные растворы

4.8.1 Стандартный раствор А массовой концентрации 0,010 г/дм^3 кофеина, применяется для декофеинизированного кофе.

Доводят исходный раствор (4.7) до комнатной температуры. С помощью пипетки (5.12) помещают 2 см^3 этого раствора в мерную колбу с одной отметкой вместимостью 100 см^3. Доливают до метки водой и перемешивают.

Этот раствор готовят в день использования.

4.8.2 Стандартный раствор Б массовой концентрации 0,05 г/дм^3 кофеина, применяется для обычного кофе.

Доводят исходный раствор (4.7) до комнатной температуры. С помощью пипетки (5.12) помещают 5 см^3 этого раствора в мерную колбу с одной отметкой вместимостью 50 см^3. Доливают до метки водой и перемешивают.

5 Средства измерений и оборудование

Обычное лабораторное оборудование, в частности:

5.1 Хроматограф для ВЭЖХ, снабженный ультрафиолетовым детектором, позволяющим проводить измерения в диапазоне от 254 до 280 нм, и самописцем. Предпочтительна длина волны ближе к 280 нм, поскольку максимальная абсорбция кофеина происходит при длине волны 272 нм.

5.2 Хроматографическая колонка для ВЭЖХ, типа C_{18}, предпочтительно со сферическими частичками и с эффективностью не менее 5000 теоретических пластин**.

---

* Мерк 5867 является рекомендуемым веществом. Эта информация дана для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает его применение.

** Сферисорб 5 ОДС, Сферисорб 10 ОДС, Нуклеосил 5 C_{18}, Нуклеосил 7 C_{18}, Нуклеосил 10 C_{18}, Зорбекс БП C_{18}, Хиперсил ОДС, КП-Сфер C_{18}, Бондепек C_{18}, Супелкосил Л C_{18} и Партисфере C_{18} — примеры подходящего оборудования, имеющегося в продаже. Эта информация дана для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает их применение. В настоящем стандарте условия хроматографирования и состав мобильной фазы (4.4) указаны для Картриджа колонки Партисфере C_{18} с размерами 110 × 4,6 мм, заполненной в Вотмен Картридж системе. При использовании других типов колонки могут потребоваться альтернативные мобильная фаза и условия хроматографирования.

Теоретическая пластина номер N колонки может быть вычислена исходя из формы пика, полученного при впрыскивании (инжекции) стандартного раствора чистого кофеина (4.8) по формуле

$$N = 5{,}54\left(\frac{t}{W_{0,5}}\right)^2, \quad (1)$$

где t — время удерживания пика;

$W_{0,5}$ — ширина пика на половине высоты.

5.3 Очистительная колонка для обращенно-фазовой хроматографии вместимостью 3 см^3, заполненная силикагелем, модифицированным фенильными группами, частички которого имеют средний размер около 40 мкм*.

5.4 Кофейная мельница, пригодная для размалывания зерен жареного кофе.

5.5 Кофейная мельница с зубчатым колесом и с охлаждающей рубашкой или лабораторная кофейная мельница с лопастями и охлаждающей рубашкой, или любая другая кофейная мельница, пригодная для размалывания зерен зеленого кофе.

5.6 Сито из проволочной ткани с отверстиями размером 630 мкм.

5.7 Фильтры с размером пор 0,45 мкм.

5.8 Водяная баня, обеспечивающая поддержание температуры (90 ± 1) °С с непрерывным помешиванием.

5.9 Весы лабораторные по *ГОСТ 24104* с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,1 мг.

5.10 Бутылка вместимостью 250 см^3 с завинчивающимся колпачком.

5.11 Колбы мерные с одной отметкой вместимостью 10, 50, 100, 250 см^3 и 2 дм^3.

5.12 Пипетки вместимостью 2,0, 5,0 и 10,0 см^3.

6 Отбор проб

Отбор проб зеленого (сырого) кофе в мешках — по ИСО 4072 *[2]*.

Отбор проб жареного и растворимого кофе — по ГОСТ 15113.0.

Отбор проб растворимого кофе в коробках с вкладышами — по ИСО 6670 *[3]*.

7 Подготовка анализируемой пробы

При необходимости анализируемую пробу размалывают, используя кофейные мельницы (5.4 или 5.5) до тех пор, пока проба не будет проходить через сито (5.6).

8 Методика проведения анализа

8.1 Определение массовой доли сухого вещества в пробе

Рассчитывают массовую долю сухого вещества в анализируемой пробе (раздел 7), в зависимости от массовой доли влаги, определенной по ИСО 6673 *[4]* — для зеленого (сырого) кофе, *по ИСО 11294 [5] — для жареного кофе* и по *ГОСТ Р 52612* — для растворимого кофе.

8.2 Навеска для анализа

8.2.1 Обычный и декофеинизированный зеленый (сырой) или жареный кофе

Взвешивают 1 г анализируемой пробы (раздел 7) с точностью до 0,0001 г.

8.2.2 Обычный и декофеинизированный растворимый кофе

Взвешивают 0,5 г анализируемой пробы (раздел 7) с точностью до 0,0001 г.

8.3 Экстрагирование кофеина

8.3.1 Навеску (8.2.1 или 8.2.2) помещают в бутылку вместимостью 250 см^3 (5.10). Добавляют (4,0 ± 0,5) г оксида магния (4.6) и 100 см^3 воды. Взвешивают бутылку с содержимым с точностью до 0,1 г.

8.3.2 Укупоривают бутылку и перемешивают ее содержимое. Помещают бутылку с содержимым в водяную баню (5.8) и нагревают до температуры 90 °С при непрерывном помешивании в течение 20 мин.

---

* Колонка Бейкер СПЕ вместимостью 3 см^3, модифицированная фенильными группами в обращенной фазе, — пример подходящего оборудования, имеющегося в продаже. Эта информация дана для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает ее применение.

Охлаждают бутылку с содержимым и снова взвешивают с точностью до 0,1 г. Масса охлажденной бутылки должна быть равна массе, определенной по 8.3.1.

8.3.3 Если массы отличаются, проводят повторное экстрагирование (8.3.1 и 8.3.2), используя другую навеску для анализа.

8.3.4 Дают раствору отстояться. Удаляют часть раствора и фильтруют его через фильтр (5.7).

8.4 Очистка раствора

До того, как произойдет разделение раствора, активируют очистительную колонку (5.3).

8.4.1 Подготовка очистительной колонки

Устанавливают очистительную колонку, как показано на рисунке 1.

Открывают запорный кран и промывают колонку 5 $см^3$ метанола (4.1), регулируя запорный кран так, чтобы метанол вытекал по каплям. Когда на поверхности силикагеля останется 1—2 мм метанола, запорный кран закрывают. Добавляют 5 $см^3$ воды, открывают запорный кран, затем закрывают его снова, когда на поверхности силикагеля останется 1—2 мм воды.

Не допускают высыхания колонки, в противном случае необходимо повторить ее подготовку.

8.4.2 Абсорбция кофеина

С помощью пипетки вводят в колонку либо:

а) 2 $см^3$ отфильтрованного раствора, полученного по 8.3.4, для обычного кофе, или

б) 10 $см^3$ отфильтрованного раствора, полученного по 8.3.4, для декофеинизированного кофе.

Регулируют запорный кран так, чтобы раствор вытекал по каплям. Закрывают запорный кран, когда уровень раствора опустится ниже поверхности силикагеля.

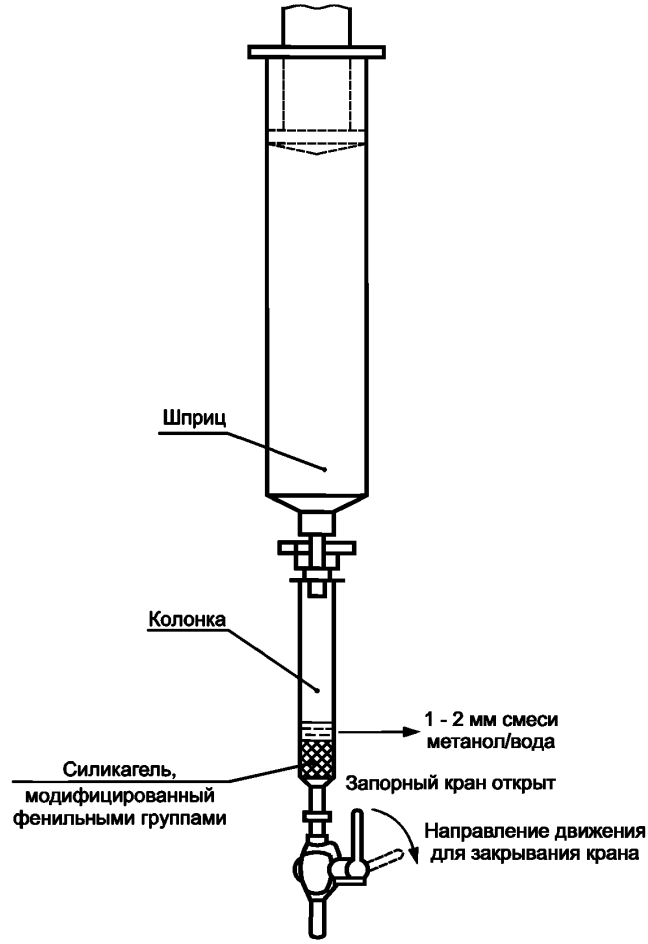

Рисунок 1 — Подготовка очистительной колонки

8.4.3 Удаление нежелательных соединений

Открывают запорный кран и добавляют 2,5 см^3 смеси — раствор аммиака/метанол (4.2). Закрывают запорный кран, когда уровень этой смеси опустится ниже поверхности силикагеля.

Добавляют еще 2,5 см^3 смеси (4.2) и дают ей возможность полностью пройти через колонку. Пропускают около 20 см^3 воздуха через колонку, чтобы удалить как можно больше смеси (4.2).

Примечание — Колонка может высохнуть на этой стадии проведения анализа.

8.4.4 Элюирование кофеина

Помещают мерную колбу с одной отметкой вместимостью 10 см^3 (5.11) под колонку. Открывают запорный кран и добавляют 7,5 см^3 элюентного раствора (4.3), регулируя запорный кран так, чтобы раствор вытекал по каплям. Дают возможность элюентному раствору полностью вытечь в мерную колбу. Добавляют воду до метки и перемешивают содержимое.

Примечание — Очистительная колонка может быть восстановлена метанолом, как указано в 8.4.1. Ее можно использовать для целей очистки не более десяти раз.

8.5 Проведение анализа методом ВЭЖХ

8.5.1 Подготовка хроматографа (5.1)

Условия хроматографического разделения:

- скорость потока мобильной фазы (4.4): 0,5—1,5 см^3/мин в зависимости от применяемой колонки (5.2);
- температура колонки (5.2): 40 °С.

Примечание — Отделение пика может быть улучшено путем повышения температуры колонки, но она не должна превышать 60 °С.

8.5.2 Проведение анализа

Убедившись в стабильности скорости потока мобильной фазы (4.4) и температуры, впрыскивают в колонку 10 мкл (0,01 см^3) испытуемого раствора, полученного по 8.4.4, и затем такой же объем стандартного раствора кофеина (4.8.1 или 4.8.2).

Примечание — В стандартных методиках проведения анализа соблюдается закон Беера для концентрации кофеина до 0,0250 г/дм^3. Этот уровень выше, чем концентрации кофеина, используемые в этом методе анализа. В противном случае, например, из-за отклонений измерительных приборов, следует построить калибровочную кривую зависимости экстинкции от концентрации кофеина.

9 Обработка результатов измерений

9.1 Массовую долю кофеина в пробе, выраженную в граммах на 100 г сухого вещества для обычного зеленого (сырого), жареного и растворимого кофе, вычисляют по формуле

$$\frac{A_x}{A_c} c_1 \frac{10 \cdot 100}{2m_0 \cdot 1000} \cdot \frac{100}{RS} 100, \qquad (2)$$

где A_x — площадь пика кофеина, полученного для испытуемого раствора;

A_c — площадь пика кофеина, полученного для стандартного раствора кофеина;

c_1 — массовая концентрация стандартного раствора кофеина (4.8.2), г/дм^3;

m_0 — масса навески для анализа, г;

RS — массовая доля сухого вещества в пробе (8.1), %.

9.2 Массовую долю кофеина в пробе, выраженную в граммах на 100 г сухого вещества для декофеинизированного зеленого (сырого), жареного и растворимого кофе, вычисляют по формуле

$$\frac{A_x}{A_c} c_2 \frac{10 \cdot 100}{10m_0 \cdot 1000} \cdot \frac{100}{RS} 100, \qquad (3)$$

где c_2 — массовая концентрация стандартного раствора кофеина (4.8.1), г/дм^3.

10 Требования к точности результатов измерений

10.1 Результаты межлабораторных испытаний

Межлабораторные испытания были проведены на международном уровне под эгидой ИСО/ТК 34/ПК 15 «Кофе», в которых участвовали 18 лабораторий.

В таблице 1 приведены полученные значения пределов повторяемости и воспроизводимости. Отбор проб и методики проведения анализа — в соответствии с *ГОСТ Р ИСО 5725-1, ГОСТ Р ИСО 5725-2.*

Таблица 1 — Значения пределов повторяемости и воспроизводимости

Проба	Массовая доля кофеина, %	Предел повторяемости,%, при $P = 0,95$	Предел воспроизводимости, %, при $P = 0,95$
Жареные кофейные зерна	≈ 2 ≈ 1	0,07 0,04	0,34 0,12
Декофеинизированные жареные кофейные зерна	< 0,1	0,01	0,02
Растворимый кофе	≈ 4	0,09	0,36
Декофеинизированный растворимый кофе	< 0,3	0,02	0,03

10.2 Предел повторяемости

Абсолютное значение разности результатов двух независимых единичных испытаний, полученное при использовании одного и того же метода, на одном и том же испытуемом материале, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, на одном и том же оборудовании в короткий промежуток времени, не должно превышать значений, приведенных в таблице 1.

10.3 Предел воспроизводимости

Абсолютное значение разности результатов двух независимых единичных испытаний, проведенных по одному и тому же методу, на одном и том же испытуемом материале, в различных лабораториях, разными операторами, на различном оборудовании, не должно превышать значений, приведенных в таблице 1.

10.4 Границы относительной погрешности определения массовой доли кофеина методом ВЭЖХ — ± 10 % при P = 0,95.

11 Протокол испытаний

В протоколе испытаний должны быть указаны использованный метод испытаний и полученные результаты. Должны быть также указаны все детали испытаний, не учтенные настоящим стандартом или рассматриваемые как необязательные, а также любые обстоятельства, которые могли повлиять на результаты испытаний.

Протокол испытаний должен содержать всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы.

Библиография

[1] ИСО 4052:1983 Кофе. Определение содержания кофеина (эталонный метод)*
[2] ИСО 4072:1982 Кофе зеленый (сырой) в мешках. Отбор проб*
[3] ИСО 6670:2002 Кофе растворимый в коробках с вкладышами. Отбор проб*
[4] ИСО 6673:2003 Кофе зеленый (сырой). Определение потери массы при температуре 105 °С*
[5] ИСО 11294:1994 Кофе молотый жареный. Определение массовой доли влаги. Метод определения потери массы при 103 °С (стандартное испытание)*

* 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.

УДК 663.938.8:006.354 ОКС 67.140.20 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: кофе зеленый (сырой), кофе жареный, кофе растворимый, кофе декофеинизированный, кофеин, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), предел повторяемости, предел воспроизводимости, границы относительной погрешности

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 17.01.2007. Подписано в печать 15.02.2007. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,80. Тираж 324 экз. Зак. 91. С 3664.

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