

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора ГП  
«Центр эталонов, стандартизации и метрологии»  
В.П. Лобко

12 марта 1999 г.

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный  
санитарный врач Республики  
Беларусь, заместитель министра  
здравоохранения  
В.П. Филонов

30 марта 1999 г.

Регистрационный № 120-9711

## МЕТОДИКА

# ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИЙ КОФЕИНА В КОФЕ РАСТВОРИМОМ, МОЛОТОМ, ЗЕРНАХ, ЧАЕ И ТОНИЗИРУЮЩИХ НАПИТКАХ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

СОГЛАСОВАНО

Главный метролог Минздрава  
Республики Беларусь  
Е.В. Бондаренко

5 февраля 1998 г.

Минск 1999

[Перейти к оглавлению](#)

## **Методика выполнения измерений концентраций кофеина в кофе растворимом...**

**Учреждение-разработчик:** Белорусский научно-исследовательский санитарно-гигиенический институт

**Авторы:** канд. хим. наук Н.И. Марусич, Н.П. Лешошук

**Рецензенты:** Л.В. Зубкевич, А.Л. Перцовский, П.И. Десятик, Ю.И. Жданов, М.П. Петрович

Методика выполнения измерений концентраций кофеина в кофе растворимом, молотом, зернах, чае и тонизирующих напитках методом газожидкостной хроматографии основана на переэкстракции кофеина из водного раствора в органический растворитель с последующим хроматографированием его с использованием пламенно-ионизационного детектора.

Методика предназначена для санэпиднадзора Министерства здравоохранения Республики Беларусь, научно-исследовательских работ, связанных с определением кофеина.

Методика утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

# Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕЩЕСТВА</b> .....	4
<b>2. НОРМЫ ПОГРЕШНОСТИ</b> .....	5
<b>3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ</b> .....	6
3.1. Средства измерений .....	6
3.2. Вспомогательные устройства .....	6
3.3. Материалы и реактивы .....	7
<b>4. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ</b> .....	7
<b>5. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ</b> .....	8
<b>6. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРА</b> .....	8
<b>7. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ</b> .....	8
<b>8. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ</b> .....	8
8.2. Подготовка измерительной аппаратуры .....	9
8.3. Приготовление растворов .....	9
8.4. Установление градуировочной характеристики .....	10
Условия хроматографического анализа .....	11
<b>9. ОТБОР ПРОБ</b> .....	12
<b>10. ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ</b> .....	12
10.1. Подготовка образца напитка .....	12
10.2. Подготовка образца кофе в зернах, чая .....	13
10.3. Подготовка образца растворимого кофе .....	13
<b>11. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ</b> .....	14
<b>12. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ</b> .....	16
<b>13. КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ МВИ</b> .....	17

## ВВЕДЕНИЕ

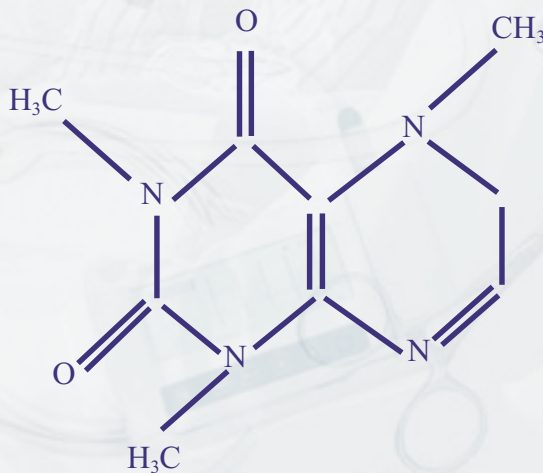
Настоящий метод устанавливает методику выполнения измерений (МВИ) концентраций кофеина в кофеиносодержащих продуктах в диапазоне концентраций кофеина 0,002–5,0%.

### 1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕЩЕСТВА

Химическое название по номенклатуре: 1,3,7-триметилксантин.

Молекулярная масса 194,2. Брутто-формула:  $C_8H_{10}N_4O_2$ .

Структурная формула:



### *Методика выполнения измерений концентраций кофеина в кофе растворимом...*

Кофеин — белый кристаллический порошок, без запаха, горького вкуса. Температура плавления  $234,5^{\circ}\text{C}$ . Хорошо растворим в горячей воде, хлороформе, бензоле и сероуглероде. Трудно растворим в холодной воде и спирте. При нагревании возгоняется ( $180^{\circ}\text{C}$ ). В водном растворе не дает щелочной реакции, но образует с кислотами соли, сильно гидролизующиеся в водном растворе.

Содержание кофеина в растворимом кофе, согласно ГОСТу 29148-91, должно быть не менее 2,8% в пересчете на сухую массу.

В кофе натуральном жареном, согласно ГОСТу 6805-88, — не менее 0,7% в пересчете на сухую массу.

В напитках — согласно указанной рецептуре.

## **2. НОРМЫ ПОГРЕШНОСТИ**

Настоящая МВИ обеспечивает выполнение измерения концентраций кофеина с погрешностью 27,6% отн. при доверительной вероятности 0,95. Нижний предел измерения — 20 мкг/см<sup>2</sup>.

### 3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

#### 3.1. Средства измерений

Газо-жидкостной хроматограф с пламенно-ионизационным детектором (Газохром 3700)	ТУ 25-0585.110-86
Весы аналитические ВЛР-200	ГОСТ 24104-80Е
Меры массы	ГОСТ 7328-82
Линейка измерительная с ценой деления 1 мм, диапазоном измерения 0–150 мм	ГОСТ 427-75
Пипетки 4-2-1, 4-2-2, 6-2-5, 6-2-10	ГОСТ 20292-74
Колба мерная 2-100-2, 2-50-2	ГОСТ 1770-74
Пробирка с взаимозаменяемым конусом П-2-10-14/23 ХС	ГОСТ 1770-74
Микрошприц МШ-10	ТУ 2-833-106
Секундомер, 2 класс точности	ТУ 25-1819.0021-90

#### 3.2. Вспомогательные устройства

Колонка хроматографическая стеклянная длиной 1 м и диаметром 3 мм	ГОСТ 25336-82
Делительная воронка вместимостью 50 см <sup>3</sup>	ГОСТ 25336-82
Стакан химический В-1-150-ТС	ГОСТ 25336-82
Часовое стекло	ГОСТ 25336-82
Воронка лабораторная В-56-80 ХС	ГОСТ 25336-82
Груша резиновая	ГОСТ 25336-82
Колба остродонная ОП-50-14/23	ГОСТ 14919
Электроплитка бытовая	ГОСТ 19423-81
Электрокофемолка ЭКМУ 50	ГОСТ 19423-81

## **Методика выполнения измерений концентраций кофеина в кофе растворимом...**

Испаритель ротационный ИР-1М

ТУ 25-11-917-76

Могут быть использованы другие средства измерений и вспомогательные устройства, по точности не уступающие рекомендуемому в методике.

### **3.3. Материалы и реактивы**

Азот, о.с.ч.

ГОСТ 9293-74

Водород технический

ГОСТ 3022-70

Воздух

ГОСТ 11882-73

Натрий сернокислый, безводный, ч.д.а.

ГОСТ 4166-76

Хлороформ, ч.д.а.

ГОСТ 3160-61

Кофеин, хим. реактив, 99,5%, ч.

производство фирмы «MERK»

Германия

Хроматон N-AW Super с 5% SE-30 (0,25–0,32 мм)

Чехия

Вода дистиллированная

ГОСТ 6709-72

Гидроокись калия, ч.д.а.

ГОСТ 24363-80

Фильтр беззольный (красная лента)

Могут быть использованы реактивы-эквиваленты, по квалификации не уступающие указанным в методике, не влияющие на результат измерения.

## **4. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ**

Метод определения кофеина основан на экстракции его из сухого образца горячей водой с последующей переэкстракцией в хлороформ и определением методом газожидкостной хроматографией с использованием пламенно-ионизационного детектора и колонки, заполненной Хроматоном N-AW-Super с нанесенной жидкой фазой SE-30, 5%.

Коэкстрактивные вещества определению не мешают.

## **5. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ**

Анализ по данной методике должен выполняться согласно инструкции «Основные правила безопасности работы в химических лабораториях» (М.: Химия, 1979) и инструкции по эксплуатации газо-жидкостного хроматографа. Все работы по очистке растворителей и экстракции необходимо проводить под тягой.

## **6. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРА**

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее специальное образование или лица со средним специальным образованием, изучившие работу на газовом хроматографе.

## **7. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ**

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТу 15150-69 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ ,
- атмосферное давление 84,0–106,7 кПа,
- влажность воздуха не более 80% при температуре  $25^\circ\text{C}$ .

## **8. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ**

**8.1. Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы:** подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, установление градуировочной характеристики, отбор проб.



## **8.2. Подготовка измерительной аппаратуры**

Стеклянную хроматографическую колонку промывают горячей водой, затем смесью этиловый спирт — эфир — гексан (1:1:1), сушат при температуре 100°C в сушильном шкафу. После этого набивают колонку готовым сорбентом, используя водоструйный насос, вставляют в хроматограф и, не присоединяя к детектору, кондиционируют при постоянном повышении температуры на 1°C в минуту до температуры 200°C, затем при этой температуре выдерживают в токе азота в течение 10 ч. Колонку подсоединяют к детектору и проверяют дрейф нулевой линии. Колонка считается готовой, если в течение одного часа дрейф нулевой линии не превышает 5% от длины шкалы регистратора при чувствительности, соответствующей минимально определяемой концентрации.

## **8.3. Приготовление растворов**

8.3.1. 15% раствор гидроокиси калия готовят растворением 15 г гидроокиси калия в 85 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

8.3.2. Стандартный раствор № 1. В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают навеску кофеина 0,1 г, взятую с точностью 0,0001 г и растворяют в горячей дистиллированной воде, затем охлаждают до комнатной температуры и доводят дистиллированной водой до метки. Концентрация кофеина в воде составляет 1000 мкг/см<sup>3</sup>. Раствор устойчив при хранении в холодильнике в течение месяца.

8.3.3. Стандартный раствор № 2. В мерную колбу на 50 см<sup>3</sup> пипеткой 6-2-5 вносят 5 см<sup>3</sup> стандартного раствора № 1 и доводят дистиллированной водой до метки. Концентрация кофеина в растворе составляет 100 мкг/см<sup>3</sup>.

#### 8.4. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость высоты хроматографического пика от концентрации кофеина в растворе, устанавливают по трем сериям растворов, каждая из которых состоит из 4-х концентраций.

Растворы готовят в градуированных пробирках с пробками вместимостью ~10 см<sup>3</sup>. Для этого в каждую пробирку (табл. 1) вносят пипеткой стандартные растворы № 2 или № 1, 0,5 см<sup>3</sup> 15% раствора гидроксида калия (для фиксации границы раздела двух жидкостей), перемешивают, прибавляют по 1 мл хлороформа и экстрагируют в течение 2 мин энергичным встряхиванием. Дают отстояться в течение 20 мин. Из нижнего хлороформенного слоя отбирают 3–5 мкл хлороформа и вводят 2 мкл отобранной пробы в хроматограф. Каждый раствор хроматографируют не менее 3 раз, начиная с самой низкой концентрации.

Таблица 1

#### *Серии растворов, концентрации*

№ пробы	1	2	3	4
Объем стандартного раствора № 2, см <sup>3</sup>	0,20	0,50	1,00	0,25*
Содержание кофеина в экстрагируемом объеме хлороформа, мкг	20,00 (0,002%)	50,00 (0,005%)	100,00 (0,01%)	250,00 (0,025%)

\*для пробы №4 использовался раствор № 1

### **Условия хроматографического анализа**

Температура термостата колонки.....	190°C
Температура испарителя .....	250°C
Температура детектора .....	200°C
Скорость потока газа-носителя, азота, о.с.ч. . . . .	30,0 мл/мин
Скорость потока водорода.....	30,0 мл/мин
Скорость потока воздуха .....	300,0 мл/мин
Скорость диаграммной ленты .....	360 мм/ч
Объем вводимой пробы .....	2 мкл
Время удерживания кофеина .....	2 мин
Чувствительность для кофе, чая.....	$16 \cdot 10^{-11}$
Чувствительность для кофейных напитков.....	$2 \cdot 10^{-11}$

Для каждой концентрации измеряют высоты пиков и вычисляют среднее значение трех параллельных измерений. Расхождение между минимальным и максимальным значениями высот пиков не должно превышать 12,3%. Строят градуировочный график: по оси абсцисс откладывают концентрацию ( $C$ , мкг/см<sup>3</sup>), по оси ординат — высоту пиков ( $h$ , мм).

При построении градуировочного графика используют средние значения концентраций и высот пиков, полученные из трех серий градуировочных растворов.

Градуировочный график линеен для диапазона концентраций 20–1000 мкг/см<sup>3</sup> кофеина.

## **9. ОТБОР ПРОБ**

Методы отбора проб и подготовки их к анализу — по ГОСТу 15113.0.

## **10. ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ**

### **10.1. Подготовка образца напитка**

В зависимости от содержания в кофейном напитке взвешивают 1–5 см<sup>3</sup> образца с точностью 0,0001 г, вливают его в делительную воронку, добавляют 0,5 см<sup>3</sup> 15% калия гидроксид, перемешивают и приливают 1 см<sup>3</sup> хлороформа, экстрагируют в течение 2 мин путем энергичного встряхивания. После отстаивания нижний слой хлороформа сливают в колбочку через воронку с осушителем (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Экстракцию повторяют еще раз таким же объемом хлороформа. Хлороформенный экстракт упаривают на ротационном испарителе досуха. Сухой остаток растворяют в 1 см<sup>3</sup> хлороформа, 2 мкл его вводят в хроматограф и хроматографируют согласно условиям п. 8.4.

Если напиток газированный, перед началом анализа его оставляют открытым на 2–3 ч для удаления из него газа.

## **10.2. Подготовка образца кофе в зернах, чая**

Образец измельчают на кофемолке, взвешивают его 1,000 г, помещают в стакан на 150 см<sup>3</sup>, заливают ~70 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, доводят до кипения на электроплитке и кипятят в течение 5 мин. Отстаивают, фильтруют, трижды промывая осадок 5 см<sup>3</sup> горячей дистиллированной воды. После охлаждения раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводят до метки водой и перемешивают. В пробирку вместимостью ~10 см<sup>3</sup> пипеткой отбирают 2 см<sup>3</sup> охлажденного экстракта, прибавляют 0,5 см<sup>3</sup> 15% КОН и 1 см<sup>3</sup> хлороформа. Закрывают пробкой и энергично встряхивают в течение 2 мин, оставляют экстракт на 20 мин для расслаивания. 2 мкл хлороформенного экстракта хроматографируют согласно условиям п. 8.4.

## **10.3. Подготовка образца растворимого кофе**

Взвешивают навеску образца 1,000 г растворимого кофе, всыпают в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, растворяют его в небольшом количестве дистиллированной воды, затем доводят объем до метки дистиллятом, перемешивают, отбирают 2 см<sup>3</sup> пробы в пробирку вместимостью 10 см<sup>3</sup>. Далее поступают как указано в п. 10.2.

Содержание кофеина в пробах (п. 10.1–10.3) находят по градуировочному графику. При концентрациях кофеина более 1000 мг/м<sup>3</sup> проводят разведение экстракта хлороформом, которое учитывают в формуле расчета.

## 11. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Концентрацию кофеина (С) в процентах (%) рассчитывают по формулам:

1) для образцов кофеинсодержащих напитков (п. 10.1.)

$$C = \frac{C_1 \times V_1 \times 100}{m \times 10^6},$$

где  $C_1$  — концентрация кофеина, найденная по градуировочному графику, мкг/см<sup>3</sup>;

$V_1$  — объем хлороформа, взятый для экстракции пробы напитка, см<sup>3</sup>;

$m$  — масса напитка, взятого для анализа, г;

$10^6$  — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

2) для образцов кофе в зернах, чае и растворимого кофе в пересчете на сухое вещество (п. 10.2., 10.3.)

$$C = \frac{C_1 \times A \times V_1 \times V_3 \times 100 \times 100}{V_2 \times m \times (100 - W) \times 10^6},$$

где  $C_1$  — концентрация кофеина в анализируемом объеме, найденная по градуировочному графику, мкг/см<sup>3</sup>;

$V_2$  — объем водного раствора пробы, взятого для экстракции, см<sup>3</sup>;

$m$  — масса образца, взятого для анализа, г;

$W$  — массовая доля влаги, анализируемого образца, определенная по ГОСТу 15113.4, %;

$A$  — коэффициент разведения;

*Методика выполнения измерений концентраций кофеина в кофе растворимом...*

$V_1$  — объем хлороформа, взятый для растворения сухого остатка, см<sup>3</sup>;

$V_3$  — общий объем общей пробы образца, см<sup>3</sup>.

За результат анализа принимают среднее арифметическое трех параллельных измерений концентраций кофеина ( $C_{cp}$ ), расхождение между минимальным и максимальным значениями которых не должно превышать 25,5%.

Гарантированный результат анализа представляют в следующем виде:  $C = C_{cp} \pm \Delta$ , где  $\Delta$  — погрешность измерения, равная 27,6%, которую необходимо перевести в абсолютные

единицы по формуле:  $\frac{\Delta \times C_{cp}}{100}$

## **12. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ**

Результаты измерений оформляют записью в журнале по форме, приведенной ниже.

*Форма рабочего журнала результатов измерений кофеина в образце*

Дата	Образец	Площадь пика кофеина, мм <sup>2</sup>	Концентрация кофеина, найденная по градуиров. графику, мм/см <sup>3</sup>	Результаты измерения, % масс



### 13. КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ МВИ

Внутренний оперативный контроль (ВОК) показателей качества результатов измерений концентраций кофеина в молотом, растворимом кофе, чае и тонизирующих напитках методом газо-жидкостной хроматографии осуществляют с целью получения оперативной информации о качестве этих анализов и принятия при необходимости оперативных мер по его повышению. ВОК осуществляют по трем показателям: стабильность градуировочной характеристики, сходимость параллельных результатов, точность результатов.

Таблица 2

#### *Нормативы оперативного контроля*

Погрешность градуировочного графика, %	Сходимость параллельных измерений, % d	Точность (погрешность) результатов анализа, % К
14,3	25,5	27,6

13.1. Контроль стабильности градуировочного графика проводят при смене основных реактивов, но не реже 1 раза в месяц.

Средствами контроля являются градуировочные растворы, приготовленные по п. 8.4.

При контроле стабильности градуировочного графика проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание кофеина в которых должно охватывать весь диапазон концентраций 20–1000 мкг/см<sup>3</sup>.

Градуировочный график для каждого из используемых для контроля градуировочных растворов считают стабильным если величина расхождения (а) не превышает 14,3%.

$$a = \frac{(X - C) \times 100}{C} \leq 14,3$$

X — концентрация кофеина контрольного измерения, найденная по графику, мкг/см<sup>3</sup>;

C — известная концентрация градуировочного раствора, взятого для контроля стабильности градуировочного графика, мкг/см<sup>3</sup>.

Если величина расхождения (а) превышает 14,3%, делают вывод о невозможности применения градуировочного графика для дальнейших измерений. В этом случае выясняют и устраняют причины нестабильности градуировочной характеристики и повторяют контроль ее стабильности с использованием других образцов для градуировки, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики строят новый градуировочный график.

13.2. ВОК сходимости результатов определения концентраций кофеина проводят путем сравнения расхождения максимального и минимального результатов трех параллельных определений, выраженного в процентах по отношению к среднему значению, с нормативом ВОК сходимости —  $d$  (табл. 2). Установленная величина сходимости должна выполняться для каждого выполняемого измерения.

$$d_k = \frac{(X_{\max} - X_{\min})}{X_{\text{cp}}} < d,$$

где  $d$  — норматив сходимости, % (табл. 2);

$X_{\max}$  — максимальный результат, мкг/см<sup>3</sup>;

$X_{\min}$  — минимальный результат, мкг/см<sup>3</sup>;

$X_{\text{cp}}$  — среднее арифметическое значение результатов трех параллельных определений, мкг/см<sup>3</sup>.

Если  $d_k < d$ , то сходимость результатов параллельных определений признают удовлетворительной, и по ним может быть вычислен результат содержания кофеина в рабочей пробе.

При превышении норматива ВОК сходимости эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

13.3. ВОК точности (погрешности) осуществляют в течение месяца.

Средством контроля является любой градуировочный раствор, приготовленный по п. 8.3. Единичные контрольные наблюдения выполняют в одной серии с рабочими пробами (п.10.2.–10.3.), проводя градуировочный раствор через все стадии выполнения методики. Равномерно, в течение всего контролируемого периода, выполняют  $n$  его измерений и рассчитывают содержание кофеина согласно п. 11. в контрольном растворе ( $C_i$  мкг/см<sup>3</sup>), ( $n > 10$ ).

Находят среднее арифметическое значение концентраций кофеина из  $n$  наблюдений:

$$C_{\text{cp}} = \frac{\sum C_i}{n}$$

Точность контрольного измерения, а также точность результатов определения кофеина в рабочих пробах, выполненных за период, в течение которого условия проведения анализа принимают стабильными и соответствующими условиям проведения контрольного измерения, признают удовлетворительной, если  $K_k < K$ .

$$K_k = \frac{(C_{\text{cp}} - C) \times 100}{C} < K,$$

где  $C_{\text{cp}}$  — среднее значение найденного содержания кофеина в контрольном растворе, %;

$C$  — заданное содержание кофеина в контрольном растворе, %;

$K$  — норматив ВОК точности (табл. 2).