

---

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

## 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 пищевого концентрата 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
<i>Библиография . . . . .</i>	<i>7</i>

## 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.

**П р и м е ч а н и е** — 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*

**П р и м е ч а н и е** — 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.

## 4 Реактивы

Следует применять реактивы достоверяемого 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<sup>3</sup>)/метанол, смесь в соотношении 90:10 по объему.

4.3 Элюэнтный 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<sup>3</sup> метанола (4.1) в мерную колбу с одной отметкой вместимостью 2 дм<sup>3</sup> и добавляют воду до метки. Перемешивают и затем фильтруют смесь через фильтр с размером пор 0,45 мкм (5.7).

П р и м е ч а н и е — 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<sup>3</sup>.

Взвешивают 125 мг кофеина с точностью до 0,1 мг и помещают в мерную колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup>, 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<sup>3</sup> кофеина, применяется для декофеинизированного кофе.

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

Этот раствор готовят в день использования.

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

Доводят исходный раствор (4.7) до комнатной температуры. С помощью пипетки (5.12) помещают 5 см<sup>3</sup> этого раствора в мерную колбу с одной отметкой вместимостью 50 см<sup>3</sup>. 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 С<sub>18</sub>, предпочтительно со сферическими частицами 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 С<sub>18</sub>, Нуклеосил 7 С<sub>18</sub>, Нуклеосил 10 С<sub>18</sub>, Зорбекс БП С<sub>18</sub>, Хиперсил ОДС, КП-Сфер С<sub>18</sub>, Бондепек С<sub>18</sub>, Супелкосил Л С<sub>18</sub> и Партисфере С<sub>18</sub> — 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 С<sub>18</sub> 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 (инъекции) 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<sup>3</sup>, 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<sup>3</sup> с завинчивающимся колпачком.

5.11 Колбы мерные с одной отметкой вместимостью 10, 50, 100, 250 см<sup>3</sup> и 2 дм<sup>3</sup>.

5.12 Пипетки вместимостью 2,0, 5,0 и 10,0 см<sup>3</sup>.

## 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<sup>3</sup> (5.10). Добавляют (4,0 ± 0,5) г оксида магния (4.6) и 100 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup>, 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> отфильтрованного раствора, полученного по 8.3.4, для обычного кофе, или
- б) 10 см<sup>3</sup> 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.

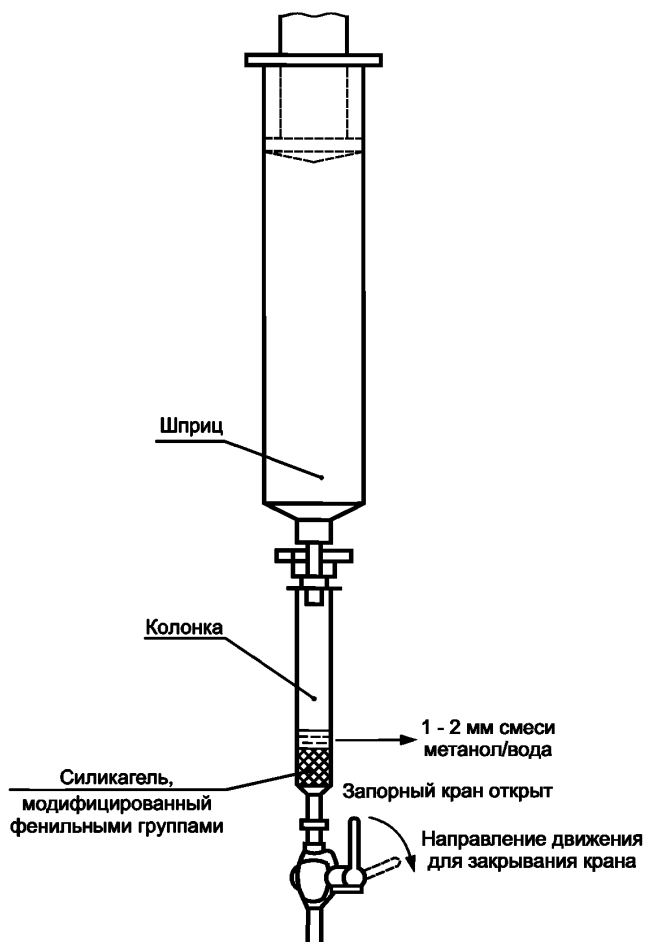


Рисунок 1 — Подготовка очистительной колонки

### 8.4.3 Удаление нежелательных соединений

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

Добавляют еще 2,5 см<sup>3</sup> смеси (4.2) и дают ей возможность полностью пройти через колонку. Пропускают около 20 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> (5.11) под колонку. Открывают запорный кран и добавляют 7,5 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup>/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<sup>3</sup>) 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 Бееера для концентрации кофеина до 0,0250 г/дм<sup>3</sup>. 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

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

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<sup>3</sup>;

$m_0$  — 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

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

где  $c_2$  — массовая концентрация стандартного раствора кофеина (4.8.1), г/дм<sup>3</sup>.



## 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.

Т а б л и ц а 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	$\approx 2$ $\approx 1$	0,07 0,04	0,34 0,12
Декофеинизированные жареные кофейные зерна	< 0,1	0,01	0,02
Растворимый кофе	$\approx 4$	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 —  $\pm 10\%$  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  $\frac{1}{8}$ . 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.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)  
Набрано во ФГУП «Стандартинформ» на ПЭВМ.  
Отпечатано в филиале ФГУП «Стандартинформ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.