

前 言

本标准等同采用国际标准 ISO 10095:1992《咖啡——咖啡因含量的测定——高效液相色谱法》。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由农业部热带作物及制品标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：华南热带农产品加工设计研究所。

本标准主要起草人：黄和、程雪梅、叶英。

本标准为首次发布。

咖啡 咖啡因含量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定用高效液相色谱测定普通的和脱咖啡因的生咖啡和焙炒咖啡豆,以及普通的和脱咖啡因的咖啡抽提粉中的咖啡因含量的一种方法。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

ISO 1447:1978 生咖啡——水分含量的测定(常规法)

ISO 3726:1983 速溶咖啡——在 70℃ 减压条件下减重的测定

ISO 4072 袋装咖啡取样

ISO 6670 衬里箱装速溶咖啡取样

ISO 6673:1983 生咖啡——在 105℃ 下减重的测定

3 原理

将试料放入水中,加热至 90℃,在有氧化镁存在的条件下,抽提咖啡因并过滤,然后用苯基改性二氧化硅微柱将全部抽提液纯化。使用配有紫外检测器的高效液相色谱仪测定其咖啡因含量。

4 试剂

除非另有规定,只能使用确认的分析级试剂,以及蒸馏水或脱矿物质水或与之等效纯度的水。

4.1 甲醇,液相色谱级。

4.2 氨溶液(0.3 mol/L): 甲醇,90:10 体积混合液。

4.3 洗提溶剂,纯化柱用,甲醇:水:乙酸,75:25:1 体积混合液。

4.4 流动相,甲醇:水,30:70 体积混合液。

取 600 mL 甲醇(4.1)倒入 2 L 单标容量瓶内,加水至刻度,混合后混合液用孔径为 0.45 μm 过滤器过滤。

4.5 乙醇:水,1:4 体积混合液。

4.6 氧化镁。

4.7 咖啡因储备液:相当于每升含 0.5 g 咖啡因溶液。称取 125 mg 咖啡因,精确至 0.1 mg,放入 250 mL 棕色玻璃容量瓶内,并用乙醇:水(4.5)加至半满,咖啡因溶解后,再加相同的乙醇:水混合液到刻度。

该溶液在冰箱内可保存一个月。

4.8 咖啡因标准溶液 A,相当于每升含 0.010 g 咖啡因,用于脱咖啡因的产品。

将储备液(4.7)加温至室温后,用吸移管(5.12)吸取 2 mL 移入 100 mL 单标容量瓶内,用水补充至刻度并摇匀。

该溶液于当日配制使用。

4.9 咖啡因标准溶液 B, 相当于每升含 0.05 g 咖啡因, 用于普通的产品。

将储备液(4.7)加热至室温后, 用吸移管(5.12)吸取 5 mL 移入 50 mL 单标容量瓶内, 并用水补充至刻度并摇匀。

5 仪器

普通实验室仪器, 特别是下列各项。

5.1 高效液相色谱仪, 配有紫外检测器, 允许使用的波长在 254 nm 至 280 nm 之间。装有一台带刻度记录纸的记录仪。测定时最好选择接近 280 nm 处, 因为咖啡因最大吸收波长是在 272 nm。

5.2 高效液相色谱用的色谱柱 C₁₈ 型, 最好是微球粒, 并至少具有 5 000 个理论塔板数的性能。

一条柱的理论塔板数 N , 可以根据注入纯咖啡因标准溶液, 而得到的峰形进行如下计算。

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{w_{0.5}} \right)^2 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

t ——峰的保留时间;

w ——半峰宽度。

5.3 纯化柱, 用于反相色谱(分离)法。柱的容量 3 mL, 是用于微粒平均大小为 40 μm 苯基改性的二氧化硅填充。

注: 在反相层析中, 用苯基改性的 3 mL Baker SPE 柱是一种可在市场买到的适用产品, 这是给使用本国际标准的人员提供方便的信息。而不是国际标准化组织对这产品的认可。

5.4 咖啡磨, 适用于磨碎焙炒的咖啡豆。

5.5 嵌齿轮磨, 装有冷却套; 或者分析磨、装有刀片和冷却套; 或者其他适于磨碎生咖啡豆的磨。

5.6 筛, 用金属材料织成, 其孔径大小为 630 μm 。

5.7 过滤器, 其微孔大小为 0.45 μm 。

5.8 水浴锅, 能在 90°C \pm 1°C 温度下连续搅拌工作。

5.9 分析天平, 能称量精确至 0.000 1 g。

5.10 螺旋盖瓶子, 容量为 250 mL 试剂瓶。

5.11 单标容量瓶, 容量为 10 mL、50 mL、100 mL、250 mL 和 2 L。

5.12 吸移管, 容量为 2.0 mL、5.0 mL、10.0 mL。

6 取样

袋装咖啡取样按 ISO 4072 执行。

衬里箱装速溶咖啡取样按 ISO 6670 执行。

7 试样的制备

若有必要, 用 5.4 或 5.5 所规定的设备研磨, 直至试样能通过(5.6)所述的筛网为止。

8 操作程序

8.1 干物质含量的测定

测定一部分试样中的水分含量, 用于计算干物质的含量, 并按下列方法进行。

ISO 1447 或 ISO 6673, 用于生咖啡。

ISO 3726 用于速溶咖啡。

对于其他类别的咖啡以及从咖啡衍生的产品, 将按未来的国际标准执行。

8.2 试料

8.2.1 普通的和脱咖啡因的生咖啡或焙炒咖啡：称取这种试样 1 g，精确至 0.000 1g。

8.2.2 普通的和脱咖啡因的速溶咖啡粉：称取这种试样 0.5 g，精确至 0.000 1g。

8.3 咖啡因的提取

8.3.1 把试料(8.2.1 或 8.2.2)放入 250 mL 的瓶中(5.10)，加入氧化镁 $4 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$ 以及水 100 g，称瓶和内盛物的质量，精确至 0.1 g。

8.3.2 盖好瓶子，摇匀内盛物，把瓶和内盛物置于 90°C 水浴上继续搅拌 20 min。冷却瓶子及内盛物，再次称量，精确至 0.1 g。其质量应等于 8.3.1 所测定的质量。

8.3.3 若质量不一致，取另一试料按(8.3.1 和 8.3.2)另一次提取。

8.3.4 将溶液静置，转移部分溶液并用过滤器(5.7)过滤。

8.4 溶液的提纯

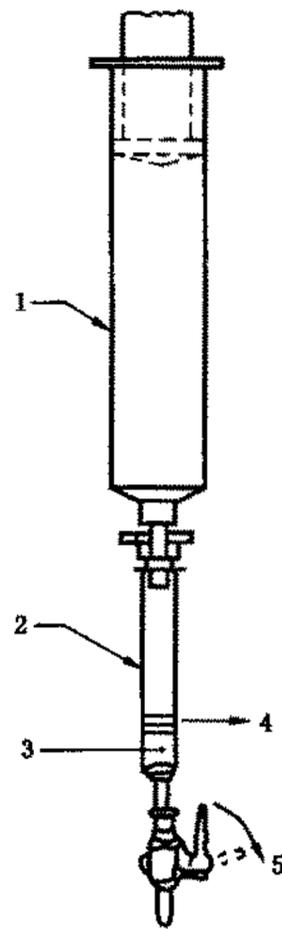
在溶液发生任何分离前，需准备好纯化柱(5.3)。

8.4.1 纯化柱的制备

装配纯化柱如图 1 所示。

打开活塞，用 5 mL 甲醇(4.1)洗涤柱子，其时需调节活塞，使其达到滴注，当在二氧化硅面保持有 1 mm~2 mm 甲醇时，关闭活塞。加水 5 mL，再次打开活塞，而当二氧化硅面保持有 1 mm~2 mm 水时，再次关闭活塞。

不允许柱干涸，否则需重做。



- 1——注射器；
 2——柱；
 3——用苯基改性的二氧化硅；
 4——1 mm~2 mm 甲醇；水；
 5——活塞打开或活塞关闭。

图 1 纯化柱的制备

8.4.2 咖啡因的吸收

用吸移管吸取溶液至柱中，选择方法有两种：

- a) 对于普通咖啡或咖啡提取物，吸取从 8.3.4 获得的滤液 2.0 mL。

b) 对于脱咖啡因咖啡或脱咖啡因的咖啡提取物,吸取从 8.3.4 获得的滤液 10.0 mL。
调节活塞,使溶液滴注,在液面刚降至低于二氧化硅面时关上活塞。

8.4.3 脱除不需要的化合物

首先打开活塞,加入 2.5 mL 氨溶液:甲醇的混合液(4.2),在液面刚刚降低于二氧化硅面时,关上活塞。再次加入 2.5 mL 混合液(4.2),使其完全流过柱。然后吹入约 30 mL 空气通过柱子,以便尽可能地脱除混合液(4.2)。

注:在这个阶段的操作程序中,柱可能变成干涸。

8.4.4 咖啡因的洗提

将 10 mL 单标容量瓶置于柱的下端,打开活塞而且加入 7.5 mL(4.3)洗提溶剂,调节活塞使之滴注,让洗提溶剂完全流入容量瓶,用水加至刻度并摇匀内盛物。

8.5 高效液相色谱分析

8.5.1 仪器的调整

装配好色谱仪(5.1),按以下条件进行调整:

按所使用的柱(见 5.2)调流动相(4.4)的流速在 0.5 mL/min 至 1.5 mL/min 之间,柱(5.2)的温度在 40°C。

注:通过升高柱温也能改善峰值分离效果,但不能超过 60°C。

8.5.2 分析

在流动相(4.4)的流速和柱温稳定后,将从 8.4.4 所得的试液 10 μL 注入柱中,而后以等体积标准咖啡因溶液(4.8 或 4.9)注入柱中。

注:常规 Beer 法则,可以满足咖啡因的浓度大到 0.025 g/L,这个水平高于用本试验方法的咖啡因浓度,但这不会导致仪器的偏差,光度与咖啡因浓度校准曲线。

9 结果的表示

样品中咖啡因含量以每 100 g 干物质所含的克数表示:

9.1 用于普通焙炒咖啡、生咖啡或速溶咖啡粉:

$$\frac{A_x}{A_c} \times c_1 \times \frac{10 \times 100}{2 \times m_0 \times 1\,000} \times \frac{100}{R_s} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

A_x ——从试液中得到的咖啡因峰的面积;

A_c ——从标准咖啡因溶液中得到的咖啡因峰的面积;

c_1 ——标准咖啡因溶液的浓度(4.9),单位为克每升(g/L);

m_0 ——试料的质量,单位为克(g);

R_s ——试样(见 8.1)干物质含量的质量百分率。

9.2 用于脱咖啡因的焙炒咖啡或生咖啡或咖啡粉:

$$\frac{A_x}{A_c} \times c_2 \times \frac{10 \times 100}{10 \times m_0 \times 1\,000} \times \frac{100}{R_s} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

式中:

c_2 ——标准咖啡因溶液的浓度(4.8),单位为克每升(g/L)。

10 精密度

10.1 重复性

在短期内,用相同的设备、相同的操作人员,并在同一实验室,用完全相同的试验材料进行试验,获得的两个单独试验的结果绝对误差,应不超过表 1 所列的数值。

表 1 重复性和再现性

样品	咖啡因含量/(g/100 g 咖啡)	重复性/(g 咖啡因/100 g 咖啡)	再现性/(g 咖啡因/100 g 咖啡)
焙炒咖啡豆	≈2	0.07	0.34
	≈1	0.04	0.12
脱咖啡因的 焙炒咖啡豆	<0.1	0.01	0.02
速溶咖啡	≈4	0.09	0.36
脱咖啡因的 速溶咖啡	<0.3	0.02	0.03

10.2 再现性

用不同的设备、不同的操作人员,在不同的实验室,对完全相同的试验材料,以相同的方法进行试验,获得的两个单独试验的结果绝对误差,应不超过表 1 所列数值。

11 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容:

- 试样;
- 使用的标准(包括发布或出版年号);
- 使用的方法(如果标准中包括几个方法);
- 结果,包括涉及“结果计算”一章的内容;
- 与基本分析步骤的差异;
- 观察到的异常现象;
- 试验日期。