

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

ISO 20481

Первое издание
2008-05-01

Откорректированная
версия
2008-12-01

Кофе и кофейные продукты. Определение содержания кофеина с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Стандартный метод

*Coffee and coffee products — Determination of the caffeine content
using high performance liquid chromatography (HPLC) – Reference
method*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/96c207ab-c1ee-4efd-aa25-980b56373433/iso-20481-2008>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO20481:2008(R)

© ISO 2008

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или вывести на экран, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на загрузку интегрированных шрифтов в компьютер, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20481:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/96c207ab-c1ee-4efd-aa25-980b56373433/iso-20481-2008>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2008

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO по соответствующему адресу, указанному ниже, или комитета-члена ISO в стране заявителя.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Предисловие

ISO (Международная организация по стандартизации) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO осуществляет тесное сотрудничество с международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Главная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Обращается внимание на возможность патентования некоторых элементов данного международного стандарта. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав.

ISO 20481 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 15, *Кофе*.

Эта откорректированная версия ISO 20481:2008 включает следующие исправления:

- a) ISO 565, ISO 648, and ISO 1042 перенесены из Раздела 2 в библиографию, и нумерация библиографических ссылок и их упоминаний соответственно везде исправлена;
- b) в 8.3, параграф 1, второе упоминание “8.2.1” заменяется на “8.2.2”;
- c) в 9.1 “ w_x ” (2 вхождения) заменяется на “ w_c ”;
- d) в 9.1 и 9.2 “ A_c ” (5 вхождений) заменяется на “ A_{st} ”;
- e) в 9.1 и 9.2 “ A_x ” (5 вхождений) заменяется на “ A_s ”;
- f) в 9.1 и 9.2 “ ρ_c ” (5 вхождений) заменяется на “ ρ_{st} ”;
- g) в 9.2 “ w'_x ” (2 вхождения) заменяется на “ w'_c ”;
- h) в 9.2 ставится запятая после w'_c ;
- i) в Таблице A.1, строка 7 (Стандартное отклонение повторяемости, s_r), столбец 13 (Растворимый кофе, Обычный гранулированный), “0,30” заменяется на “0,030”.

Кофе и кофейные продукты. Определение содержания кофеина с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Стандартный метод

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) для определения содержания кофеина в сыром, жареном и растворимом кофе, обычном и декофеинизированном, а также в продуктах растворимых кофейных смесей (например, смесь кофе/цикорий или кофейный напиток типа капучино).

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 3696, *Вода для аналитического лабораторного использования. Технические условия и методы испытания*

ISO 3726, *Кофе быстрорастворимый. Определение потери массы при температуре 70 °C в условиях пониженного давления*

ISO 6673, *Кофе сырой. Определение потери массы при температуре 105 °C*

ISO 11817, *Кофе жареный молотый. Определение содержания влаги. Метод Карла Фишера (эталонный метод)*

3 Принцип

Кофеин экстрагируют из проб водой при 90 °C в присутствии оксида магния. После фильтрации содержание кофеина в экстракте определяют методом HPLC на колонке RP-18, применяя изократическое элюирование с ультрафиолетовым (UV) детектированием приблизительно при 272 нм.

Когда уместно, содержание кофеина может быть дано на основе массы сухого вещества, для чего требуется определение влаги подходящим стандартным методом.

4 Реактивы

Если не установлено иное, то следует использовать только реактивы признанной аналитической чистоты и только воду, соответствующую требованиям ISO 3696, класс 1.

4.1 Метанол, класс для HPLC.

4.2 Оксид магния (MgO), тяжелый, высокой чистоты ¹⁾.

ПРИМЕЧАНИЕ. Использование MgO существенно для срока службы аналитической колонки, особенно для зеленого (сырого) кофе. Количество используемого MgO зависит от оборудования и от типа кофейного продукта. Данные о прецизионности в приложении А были получены с использованием процедуры, описанной в этом международном стандарте.

Появление интерферирующих пиков на хроматограмме может быть обусловлено неправильной адсорбцией. В этих случаях используемый MgO подлежит проверке.

4.3 Кофеин (1,3,7-триметилксантин; 1,3,7-триметил-1*H*-пурин-2,6(3*H*,7*H*)-дион; метилтеобромин; C₈H₁₀N₄O₂), чистый безводный.

4.4 Подвижная фаза, 24 % метанола по объему в воде.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ. Следует надевать перчатки, средства защиты глаз и распределять реактивы в вытяжном шкафу (вытяжном колпаке).

Переносят 240 мл метанола (4.1) в мерную колбу емкостью 1 л с одной меткой (5.11). Дополняют водой до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм (5.2).

ПРИМЕЧАНИЕ Изменяя отношение метанола и воды, можно регулировать время удержания кофеина, чтобы оптимизировать его отделение посредством HPLC на используемой колонке.

4.5 Стандартные растворы кофеина.

4.5.1 Исходный раствор, соответствующий 200 мг/л.

Отвешивают (0,200 ± 0,001) г безводного кофеина (4.3) в мерную колбу емкостью 1 л с одной меткой (5.11). Добавляют достаточное количество теплой воды, чтобы наполнить колбу до половины. Встряхивают, чтобы растворить кофеин, охлаждают до комнатной температуры, доводят до метки водой и перемешивают.

Раствор устойчив при +4 °C в течение месяца. Хранить в холодильнике.

4.5.2 Разбавленный стандартный раствор для обычного кофе, соответствующий приблизительно 40 мг/л.

С помощью пипетки (5.12) помещают 50 мл стандартного исходного раствора кофеина (4.5.1) в мерную колбу емкостью 250 мл с одной меткой (5.11). Доводят водой до метки и перемешивают. Готовят свежий стандартный раствор ежедневно.

4.5.3 Разбавленный стандартный раствор для декофеинизированного кофе, соответствующий приблизительно 4 мг/л.

С помощью пипетки (5.12) помещают 5 мл стандартного исходного раствора кофеина (4.5.1) в мерную колбу емкостью 250 мл с одной меткой (5.11). Доводят водой до метки и перемешивают. Готовят свежий стандартный раствор ежедневно.

4.5.4 Калибровочная кривая. Для калибровочной кривой оптимальным является использование от трех до пяти точек. Рекомендуется интервал концентраций от 5 мг/л до 25 мг/л для обычного кофе и от 0,5 мг/л до 2,5 мг/л для декофеинизированных проб.

1) Merck 105867 является примером подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей настоящего международного стандарта и не является поддержкой данного продукта со стороны ISO.

5 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

5.1 Аналитические весы, обеспечивающие взвешивание с точностью $\pm 0,1$ мг.

5.2 Мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм для фильтрации подвижных фаз и разбавленных экстрактов проб.

5.3 Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный для выполнения изократического элюирования UV детектором, установленным на 272 нм (от 270 нм до 280 нм), или детектором фильтра (254 нм) и системой сбора/интеграции данных. Использование дегазатора является произвольным.

5.4 Хроматографическая колонка для HPLC минимальной длины 125 мм, заполненная материалом C18I с размером сферических частиц предпочтительно 5 мкм, с эффективностью разделения как минимум 5 000 теоретических пластинок. Теоретическое число пластин, N_{th} , колонки можно вычислить, определяя форму пика после инъекции стандартного раствора кофеина по Уравнению (1):

$$N_{th} = \left(\frac{t_r}{b} \right)^2 \times 5,54 \quad (1)$$

где

t_r время удерживания пика, в секундах;

b ширина пика на половине высоты, в секундах.

5.5 Магнитная мешалка с нагревателем и установленной водяной баней.

5.6 Ультразвуковая ванна.

5.7 Микролитровый шприц.

5.8 Кофемолка, пригодная для размола зерен жареного кофе.

5.9 Мельница с зубчатым колесом и с охлаждающей рубашкой, или лабораторная мельница с лопастями и охлаждающей рубашкой, или любой другой прибор, подходящий для размола зерен зеленого кофе.

5.10 Сито с номинальным размером отверстий 630 мкм, соответствующая требованиям ISO 565^[2], R20 серия.

5.11 Мерные колбы с одной меткой, емкостью 1 л и 250 мл, соответствующие требованиям ISO 1042^[4], класс А.

5.12 Пипетки, емкостью 50 мл и 5 мл, соответствующие требованиям ISO 648^[3], класс А.

6 Отбор проб

В лабораторию должна быть отправлена представительная проба. Повреждения или изменения во время транспортировки или хранения не допустимы.

Отбор проб не является частью метода, установленного в этом международном стандарте. Процедура отбора проб должна быть согласована заинтересованными сторонами.

Пробу для анализа следует хранить таким образом, чтобы были предотвращены любые повреждения и изменения состава.

Для испытания напитков из порошковых смесей требуется как минимум 50 г продукта (для порционных упаковок: минимум пять порций).

7 Приготовление проб для анализа

7.1 Зеленый (сырой) кофе

Зерна зеленого кофе (5.9) размалывают, так чтобы более 50 % массовой доли пробы проходило через сито (5.10). Затем берут пробу для анализа из всего хорошо перемешанного размолотого кофе.

7.2 Жареный кофе

Зерна жареного кофе (5.8) размалывают, так чтобы более 50 % массовой доли проходило через сито (5.10).

Жареный молотый кофе используется в торговых упаковках без дальнейшей обработки, кроме гомогенизации.

7.3 Растворимый кофе

Размалывание для растворимого кофе не требуется.

7.4 Смешанные напитки

Кофейные напитки из порошковых смесей гомогенизируют, используя мельницу (5.8), непосредственно перед экстрагированием, для того чтобы предотвратить разделение.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/96c207ab-c1ee-4efd-aa25-980b56373433/iso-20481-2008>

8 Процедура

8.1 Факультативное определение сухого вещества в кофе (см. 9.2)

Вычисляют содержание сухого вещества в кофе, значение которого будет использовано в 9.2, на основе содержания влаги, определенного на анализируемой пробе (Раздел 7) согласно

- ISO 6673 для зеленого кофе,
- ISO 11817 для жареного кофе,
- ISO 3726 для растворимого кофе.

Для других типов кофе и кофейных продуктов определение содержания сухого вещества должно согласовываться между заинтересованными сторонами.

8.2 Испытательный образец

8.2.1 Жареный и зеленый кофе

Взвешивают (5.1) 1 г анализируемой пробы (7.1, 7.2) с точностью до миллиграмм и помещают в мерную колбу емкостью 250 мл (5.11).

8.2.2 Растворимый кофе

Взвешивают (5.1) около 0,5 г анализируемой пробы (7.3) с точностью до миллиграмм и помещают в мерную колбу емкостью 250 мл (5.11)

8.2.3 Смешанные напитки

Взвешивают (5.1) около 1 г анализируемой пробы (7.4) с точностью до миллиграмм и помещают в мерную колбу емкостью 250 мл (5.11)).

8.3 Экстрагирование кофеина

Добавляют к испытательному образцу (8.2.1, 8.2.2 или 8.2.3) в колбе 5 г оксида магния (4.2) и около 200 мл воды. Помещают колбу в водяную баню, поддерживаемую при температуре кипения, и ждут, пока раствор не достигнет как минимум 90 °С. Продолжают нагревание колбы в водяной бане 20 мин, перемешивают время от времени, покачивая или встряхивая. Вынимают мерную колбу из водяной бани, охлаждают до комнатной температуры под водопроводным краном и восполняют объем водой. Ждут, пока не произойдет осаждение твердого вещества.

Берут аликвоту надосадочного раствора и фильтруют через фильтр с порами 0,45 мкм (5.2), отбрасывая первые несколько миллилитров. Теперь фильтрат готов для разделения методом HPLC.

8.4 Определение

8.4.1 Настройка оборудования

ВАЖНО. Подвижную фазу перед использованием следует дегазировать в течение 20 мин в ультразвуковой ванне (5.6) или прочистить гелием. Если оборудование для HPLC включает дегазатор, 10 мин будет достаточно.

Хроматограф (5.3) устанавливают согласно инструкциям изготовителя и регулируют следующим образом:

- a) скорость течения подвижной фазы (4.4): 1,0 мл/мин;
- b) UV детектор устанавливается на 272 нм (или 254 нм в случае детектора фильтра). Обеспечить, чтобы диапазон чувствительности детектора соответствовал пику стандартного раствора (в случае более чем одного стандартного раствора - более высокому пику).

8.4.2 HPLC анализ

Как только скорость течения подвижной фазы и соответствующее давление становятся стабильными, оставляют систему как минимум на 10 мин для достижения равновесия. Затем инжестируют 10 мкл стандартного раствора в колонку, используя микролитровый шприц (5.7), с последующим введением равного объема экстракта пробы (8.3). Когда используется единичный стандартный раствор, его инжестируют с регулярными интервалами (обычно после шести экстрактов пробы). После каждой серии анализа тщательно промывают хроматографическую систему и колонку метанолом объемом 50 % (4.1) и водой и ставят на место притертые пробки, если они удалялись на хранение.

9 Вычисление

9.1 Содержание кофеина в пробе

Вычисляют содержание кофеина, w_c , выраженное в процентах по массе, численно эквивалентное граммам на 100 г кофе по Уравнению (2):

$$w_c = \frac{A_s \rho_{st} V \times 100}{A_{st} m_s} = \frac{A_s \rho_{st} \times 25}{A_{st} m_s} \quad (2)$$

где

A_{st} площадь HPLC пика кофеина в произвольных единицах площади для стандартного раствора кофеина;

A_s площадь HPLC пика кофеина в произвольных единицах площади для раствора пробы;

m_s масса испытательного образца в граммах;

V объем экстрагированного раствора пробы в литрах, определенный в 8.2 ($V = 0,25$ л);

ρ_{st} массовая концентрация в граммах на литр для стандартного раствора кофеина.

ПРИМЕЧАНИЕ Высоту пика можно использовать как альтернативу площади пика.

Если используется более одного калибровочного стандарта, строят линейный калибровочный график для стандарта кофеина, чтобы получить значение угла наклона и точки пересечения. Этот калибровочный график используется для вычисления концентрации кофеина в пробе.

В качестве результата берут арифметическое среднее двух определений, проведенных в условиях повторяемости (10.2).

9.2 Факультативное определение содержания кофеина в пробе на основе массы сухого вещества (см. 8.1)

Вычисляют содержание кофеина, w'_c , выраженное в процентах по массе, численно эквивалентное граммам на 100 г, на основе сухого вещества по Уравнению (3):

$$w'_c = \frac{A_s \rho_{st} V \times 100}{A_{st} m_s w_d} \times 100 = \frac{A_s \rho_{st} \times 2\,500}{A_{st} m_s w_d} \quad (3)$$

где w_d содержание сухого вещества в пробе (граммы на 100 г), определенное согласно 8.1.

В качестве результата берут арифметическое среднее двух определений, проведенных в условиях повторяемости (10.2).

10 Прецизионность

10.1 Межлабораторное испытание

Детали межлабораторного испытания для определения прецизионности метода приведены в приложении А. Результаты для кофеина были взяты на основе анализа кофе в состоянии на момент испытания.

Пределы повторяемости и воспроизводимости, определенные в ISO 5725-1:1994^[5], 3.16 и 3.20, соответственно, вычислены согласно ISO 5725-6:1994^[7], 4.1.4.

Для оценки предела воспроизводимости по Горвитцу использовали функцию Горвитца, данную в Ссылке [9].

Значения, полученные в этом международном испытании, не применимы к другим интервалам концентраций и матрицам.

Данные о прецизионности, оцененные согласно ISO 5725-1^[5], приведены в Таблице 1.