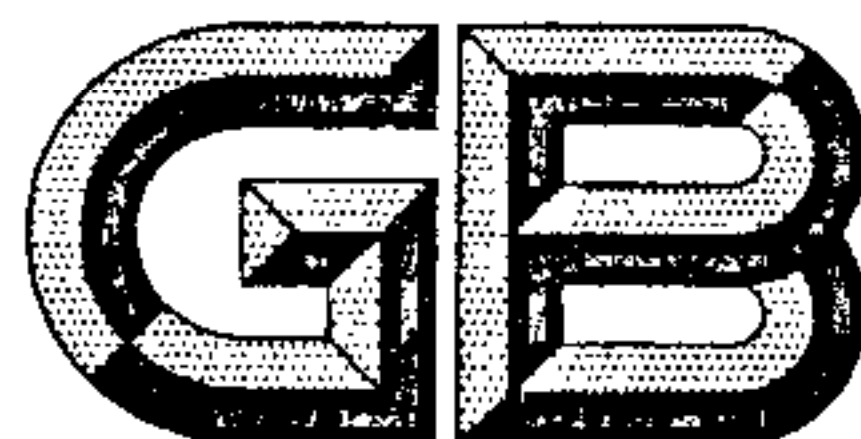




中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.139—2003
代替 GB/T 16344—1996

饮料中咖啡因的测定

Determination of caffeine in beverages

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准代替 GB/T 16344—1996《饮料中咖啡因的测定方法》。

本标准与 GB/T 16344—1996 相比主要修改如下：

——按 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第 4 部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《饮料中咖啡因的测定》。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：上海市食品卫生监督检验所、上海卫生检疫局。

本标准第一法主要起草人：何倩琼、郑理、方有宗、李绍良。

本标准第二法主要起草人：李绍良、庄慎谦、毛显林、何倩琼。

原标准于 1996 年首次发布，本次为第一次修订。

引 言

咖啡因(caffeine)又名咖啡碱,属甲基黄嘌呤化合物,化学名称为 1,3,7-三甲基黄嘌呤,具有提神醒脑等刺激中枢神经作用,但易上瘾。为此,各国制定了咖啡因在饮料中的食品卫生标准,美国、加拿大、阿根廷、日本、菲律宾规定饮料中咖啡因的含量不得超过 200 mg/L,南斯拉夫规定不得超过 120 mg/L,我国到目前为止咖啡因仅允许加入到可乐型饮料其含量不得超过 150 mg/kg,为了加强食品卫生监督管理,建立咖啡因的标准测定方法十分必要。

紫外分光光度法和高效液相色谱法(HPLC)是可乐型饮料、咖啡和茶叶以及制成品中咖啡因含量的测定方法。简单、快速、准确。

饮料中咖啡因的测定

1 范围

本标准规定了可乐型饮料、咖啡、茶叶及其制成品中咖啡因含量的测定方法-紫外分光光度法和高效液相色谱法(HPLC)。

本标准适用于可乐型饮料、咖啡、茶叶及其制成品中咖啡因的测定。

本标准紫外法检出限:可乐型饮料为 3 mg/L;咖啡、茶叶及其固体制品为 5 mg/100 g;对咖啡和茶叶的液体制品为 5 mg/L。

本标准 HPLC 法检出限:可乐型饮料为 0.72 mg/L;茶叶、咖啡及其制品为 1.8 mg/100 g。

第一法 紫外分光光度法

2 原理

咖啡因的三氯甲烷溶液在 276.5 nm 波长下有最大吸收,其吸收值的大小与咖啡因浓度成正比,从而可进行定量。

3 试剂

3.1 无水硫酸钠。

3.2 三氯甲烷 使用前重新蒸馏。

3.3 15 g/L 高锰酸钾溶液:称取 1.5 g 高锰酸钾,用水溶解并稀释至 100 mL。

3.4 亚硫酸钠和硫氰酸钾混合溶液:称取 10 g 无水亚硫酸钠(Na_2SO_3),用水溶解并稀释至 100 mL。另取 10 g 硫氰酸钾,用水溶解并稀释至 100 mL,然后二者均匀混合。

3.5 15%磷酸溶液:吸取 15 mL 磷酸置于 100 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,混匀。

3.6 200 g/L 氢氧化钠溶液:称取 20 g 氢氧化钠,用水溶解,冷却后稀释至 100 mL。

3.7 200 g/L 醋酸锌溶液:称取 20 g 醋酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ 加入 3 mL 冰乙酸,加水溶解并稀释至 100 mL。

3.8 100 g/L 亚铁氰化钾溶液:称取 10 g 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 用水溶解并稀释至 100 mL。

3.9 咖啡因标准品:含量 98.0%以上。

3.10 咖啡因标准储备液:根据咖啡因标准品的含量用重蒸三氯甲烷配制成每毫升相当于 0.5 mg 咖啡因的溶液,置于冰箱中保存。

4 仪器

紫外分光光度计。

5 分析步骤

5.1 试样的处理

5.1.1 可乐型饮料:在 250 mL 的分液漏斗中,准确移入 10.0 mL~20.0 mL 经超声脱气后的均匀可乐型饮料试样,加入 5 mL 15 g/L 高锰酸钾溶液,摇匀,静置 5 min,加入混合溶液 10 mL,摇匀,加入 50 mL 重蒸三氯甲烷。振摇 100 次,静止分层,收集三氯甲烷。水层再加入 40 mL 重蒸三氯甲烷,振摇

100 次,静置分层。合并二次三氯甲烷萃取液,并用重蒸三氯甲烷定容至 100 mL,摇匀,备用。

5.1.2 咖啡、茶叶及其固体试样:在 100 mL 烧杯中称取经粉碎成低于 30 目的均匀试样 0.5 g~2.0 g,加入 80 mL 沸水,加盖,摇匀,浸泡 2 h,然后将浸出液全部移入 100 mL 容量瓶中,加入 2 mL 200 g/L 醋酸锌溶液,加入 2 mL 100 g/L 亚铁氰化钾溶液,摇匀,用水定容至 100 mL,摇匀,静置沉淀,过滤。取滤液 5.0 mL~20.0 mL 按 5.1.1 操作进行,制备成 100 mL 三氯甲烷溶液,备用。

5.1.3 咖啡或茶叶的液体试样:在 100 mL 容量瓶中准确移入 10.0 mL~20.0 mL 均匀试样,加入 2 mL 200 g/L 醋酸锌溶液,摇匀,加入 2 mL 100 g/L 亚铁氰化钾溶液,摇匀,用水定容至 100 mL,摇匀,静置沉淀,过滤。取滤液 5.0 mL~20.0 mL 按 5.1.1 操作进行,制备成 100 mL 三氯甲烷溶液,备用。

5.2 标准曲线的绘制

从 0.5 mg/mL 的咖啡因标准储备液中,用重蒸三氯甲烷配制成浓度分别为 0、5、10、15、20 μg/mL 的标准系列,以 0 μg/mL 作参比管,调节零点,用 1 cm 比色杯于 276.5 nm 下测量吸光度,作吸光度-咖啡因浓度的标准曲线或求出直线回归方程。

5.3 测定

在 25 mL 具塞试管中,加入 5 g 无水硫酸钠,倒入 20 mL 试样的三氯甲烷制备液,摇匀,静置。将澄清的三氯甲烷用 1 cm 比色杯于 276.5 nm 测出其吸光度,根据标准曲线(直线回归方程)求出样品的吸光度相当于咖啡因的浓度 $c(\mu\text{g/mL})$ 。同时用重蒸三氯甲烷作试剂空白。

6 结果计算

按下列公式计算:

$$X_1 = \frac{(c - c_0) \times 100}{V} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

$$X_2 = \frac{(c - c_0) \times 100 \times 100 \times 100}{V_1 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(2)$$

$$X_3 = \frac{(c - c_0) \times 100 \times 100 \times 1\,000}{V_1 \times V \times 1\,000} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- X_1 ——可乐型饮料中咖啡因含量,单位为毫克每升(mg/L);
- X_2 ——咖啡、茶叶及其固体试样中咖啡因含量,单位为毫克/每百克(mg/100 g);
- X_3 ——咖啡、茶叶及其液体制成品中咖啡因含量,单位为毫克每升(mg/L);
- c ——试样吸光度相当于咖啡因浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- c_0 ——试剂空白吸光度相当于咖啡因浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- m ——称取试样的质量,单位为克(g);
- V ——移取试样的体积,单位为毫升(mL);
- V_1 ——移取试样处理后水溶液的体积,单位为毫升(mL);

7 精密度

可乐型饮料:在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%;咖啡、茶叶及其制品:在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

第二法 高效液相色谱法(HPLC)

8 原理

咖啡因的甲醇液在 286 nm 波长下有最大吸收,其吸收值的大小与咖啡因浓度成正比,从而可进行定量。

9 试剂

- 9.1 甲醇 HPLC 试剂。
- 9.2 乙腈 HPLC 试剂。
- 9.3 三氯甲烷:分析纯,必要时需重蒸。
- 9.4 超纯水:18.2 M Ω 。
- 9.5 无水硫酸钠:分析纯。
- 9.6 氯化钠:分析纯。
- 9.7 咖啡因标准品:纯度 98%以上。

10 仪器和设备

- 10.1 液相色谱。
- 10.2 色谱柱 Bondapak C₁₈ (30 cm $\times$ 3.9 mm id)。
- 10.3 预柱 RESAVE C₁₈。
- 10.4 超声清洗器(CQ250)。
- 10.5 混纤微孔滤膜。

11 分析步骤

11.1 试样处理

11.1.1 可乐型饮料

11.1.1.1 脱气:试样用超声清洗器在 40℃下超声 5 min。

11.1.1.2 过滤:取脱气试样 10.0 mL 通过混纤微孔滤膜过滤,弃去最初的 5 mL,保留后 5 mL 备用。

11.1.2 咖啡、茶叶及其制成品:称取 2 g 已经粉碎且小于 30 目的均匀试样或液体试样放入 150 mL 烧杯中,先加 2 mL~3 mL 超纯水,再加 50 mL 三氯甲烷,摇匀,在超声处理机上萃取 1 min(30 s 二次),静置 30 min,分层。将萃取液倾入另一 150 mL 烧杯。在试样中再加 50 mL 三氯甲烷,重复上述萃取操作步骤,弃去试样,合并二次萃取液,加入少无水硫酸钠和 5 mL 饱和氯化钠,过滤,滤入 100 mL 容量瓶中,用三氯甲烷定容至 100 mL。最后取 10 mL 滤液按 11.1.1.2 操作进行。

11.2 色谱条件

11.2.1 流动相:甲醇+乙腈+水=57+29+14(每升流动相中加入 0.8 mol/L 乙酸液 50 mL)。

11.2.2 流动相的流速:1.5 mL/min。

11.2.3 进样量,可乐型饮料 10 μ L,茶叶咖啡及其制成品 5 μ L~20 μ L。

11.3 标准曲线的绘制

用甲醇配制成咖啡因浓度分别为 0、20、50、100、150 μ g/mL 的标准系列,然后分别进样 10 μ L 于入 286 nm 测量峰面积,作峰面积-咖啡因浓度的标准曲线或求出直线回归方程。

11.4 测定

从试样中吸取可乐饮料 10 μ L 或咖啡、茶叶及其制品 10 μ L 进样,于 286 nm 处测其峰面积,然后根据标准曲线(或直线回归方程)得出试样的峰面积相当于咖啡因的浓度 $c(\mu$ g/mL)。同时作试剂空白。

12 结果计算

可乐型饮料中咖啡因含量(mg/L)= c

咖啡、茶叶及其制成品中咖啡因含量(mg/100 g)= $c \times V \times 100 / (m \times 1\,000)$

式中:

c ——由标准曲线求得试样稀释液中咖啡因的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

13 精密度

可乐型饮料:在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的5%;咖啡、茶叶及其制品:在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。
