



中华人民共和国国家标准

GB/T 16344—1996

饮料中咖啡因的测定方法

Method for determination of caffeine in beverages



C9709652

1996-06-19 发布

1996-09-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饮 料 中 咖 啡 因 的 测 定 方 法
GB/T 16344—1996

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码:100045

电 话:68522112

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
版权专有 不得翻印

*

开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 14 千字
1996年12月第一版 1996年12月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号: 155066·1-13383 定价 6.00 元

*

标 目 301—43

前 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,到目前为止我国仅允许咖啡因加入到可乐型饮料中,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。其方法简单、快速、准确。最低检出浓度:紫外法对可乐型饮料为3 mg/L;对咖啡、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。HPLC法对可乐型饮料为0.72 mg/L;对茶叶、咖啡及其制品为1.8 mg/100 g。

本标准的附录A为提示的附录。

本标准由卫生部卫生监督司提出。

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。

本标准主要起草人:第一篇为何倩琼、郑理、方有宗、李绍良;第二篇为李绍良、庄慎谦、毛显林、何倩琼。

本标准由卫生部委托技术归口单位卫生部食品卫生监督检验所负责解释。

中华人民共和国国家标准

GB/T 16344—1996

饮料中咖啡因的测定方法

Method for determination of caffeine in beverages

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——紫外分光光谱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。

第一篇 紫外分光光谱法

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

本标准所用试剂均为分析纯试剂,实验用水为蒸馏水。

3.1 无水硫酸钠。

3.2 三氯甲烷:使用前重新蒸馏。

3.3 1.5 % (m/V) 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 % (V/V) 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 20 % (m/V) 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 20 % (m/V) 乙酸锌溶液:称取 20 g 乙酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$,加入 3 mL 冰乙酸,用水溶解并稀释至 100 mL。

3.8 10 % (m/V) 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 样品的处理

5.1.1 可乐型饮料:在 250 mL 的分液漏斗中,准确移入 10.0~20.0 mL 经超声脱气后的均匀可乐型饮料试样,加入 1.5% 高锰酸钾溶液 5 mL,摇匀,静置 5 min,加入混合溶液 10 mL,摇匀,加入 15% 磷酸溶液 1 mL,摇匀,加入 20% 氢氧化钠溶液 1 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、茶叶及其固体制成品:在 100 mL 烧杯中称取经粉碎成低于 30 目的均匀样品 0.5~2.0 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 20% 乙酸锌溶液 2 mL,加入 10% 亚铁氰化钾溶液 2 mL,摇匀,用水定容至 100 mL,摇匀,静置沉淀,过滤。取滤液 5.0~20.0 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 咖啡或茶叶的液体制成品:在 100 mL 容量瓶中准确移入 10.0~20.0 mL 均匀样品,加入 20% 乙酸锌溶液 2 mL,摇匀,加入 10% 亚铁氰化钾溶液 2 mL,摇匀,用水定容至 100 mL,摇匀,静置沉淀,过滤。取滤液 5.0~20.0 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 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列,以 0 $\mu\text{g/mL}$ 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 样品的测定

在 25 mL 具塞试管中,加入 5 g 无水硫酸钠,倒入 20 mL 样品的三氯甲烷制备液,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(或直线回归方程)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

6.1 计算:

$$\text{可乐型饮料中咖啡因含量}(\text{mg/L}) = \frac{(c-c_0) \times 100}{V} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{咖啡、茶叶及其固体制成品中咖啡因含量}(\text{mg}/100\text{ g}) = \frac{(c-c_0) \times 100 \times 100 \times 100}{V_1 \times m \times 1\,000} \dots\dots (2)$$

$$\text{咖啡或茶叶的液体制成品中咖啡因含量}(\text{mg/L}) = \frac{(c-c_0) \times 100 \times 100 \times 1\,000}{V_1 \times V \times 1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

式中: c ——样品吸光度相当于咖啡因浓度, $\mu\text{g/mL}$;

c_0 ——试剂空白吸光度相当于咖啡因浓度, $\mu\text{g/mL}$;

m ——称取样品的质量, g;

V ——移取样品的体积, mL;

V_1 ——移取样品处理后水溶液的体积, mL。

6.2 在本实验条件下:

本法仪器检出限为 0.2 $\mu\text{g/mL}$,方法检出限可乐型饮料为 3 mg/L,咖啡、茶叶及其固体制成品为 5 mg/100 g,咖啡或茶叶的液体制成品为 5 mg/L。

标准曲线线性范围:0.0~30.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

相关系数:0.999。

方法回归率:90.1%~101.8%。

相对标准偏差:小于4.0%。

6.3 允许差:

同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值可乐型饮料为10%,咖啡、茶叶及其制品为15%。

第二篇 高效液相色谱法(HPLC)

7 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。

8 试剂

8.1 甲醇:HPLC试剂。

8.2 乙腈:HPLC试剂。

8.3 三氯甲烷:分析纯(必要时须重蒸)。

8.4 超纯水(18.2 MΩ)。

8.5 无水硫酸钠:分析纯。

8.6 氯化钠:分析纯。

8.7 咖啡因标准品:纯度98%以上。

9 仪器和设备

9.1 液相色谱。

9.2 色谱柱 Bondapak™ C18(30 cm×3.9 mm id)。

9.3 预柱 RESAVE™ C18。

9.4 超声清洗器(CQ250)。

9.5 混纤微孔滤膜。

10 分析步骤

10.1 样品的处理

10.1.1 可乐型饮料

10.1.1.1 脱气:样品用超声清洗器在40℃下超声5 min。

10.1.1.2 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。

10.1.2 咖啡、茶叶及其制成品

称取2 g已经粉碎且小于30目的均匀样品或液体样品放入150 mL烧杯中,先加2~3 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。在样品中再加50 mL三氯甲烷,重复上述萃取操作步骤,弃去样品,合并二次萃取液,加入少许无水硫酸钠和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10.1.1.2操作进行。

10.2 色谱条件

10.2.1 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)。

10.2.2 流动相的流速:1.5 mL/min。

10.2.3 进样:可乐型饮料10 μL,茶叶、咖啡及其制成品5~20 μL。



10.3 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 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列, 然后分别进样 10 μL 于波长为 286 nm 处测量峰面积, 作峰面积-咖啡因浓度的标准曲线或求出直线回归方程。

10.4 样品测定

从试样中吸取可乐饮料 10 μL 或咖啡、茶叶及其制品 5 mL 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)得出样品的峰面积相当于咖啡因的浓度 $c(\mu\text{g/mL})$ 。同时作试剂空白。

11 结果

11.1 计算:

可乐型饮料中咖啡因含量(mg/L)= c (4)

咖啡、茶叶及其制成品中咖啡因含量($\text{mg}/100\text{ g}$)= $\frac{10c}{F}$ (5)

式中: F ——进样量是 5 μL 的倍数。

11.2 在本实验条件下:

本法仪器检出限为 0.72 $\mu\text{g/mL}$, 方法检出限: 可乐型饮料为 0.72 mg/L , 咖啡、茶叶及其制品为 1.8 $\text{mg}/100\text{ g}$ 。

标准曲线线性范围: 0.0~150.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

相关系数: 0.999。

方法回收率: 91.9%~105.8%。

相对标准偏差: 小于 2%。

11.3 允许差:

同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值可乐型饮料为 5%, 咖啡、茶叶及其制品为 10%。

附 录 A

(提示的附录)

饮料中咖啡因的测定方法

A1 方法研制及验证结果

方法研制及验证结果见表 A1 及表 A2。

表 A1 紫外分光光谱法研制及验证结果

单 位	研 制 单 位		验 证 单 位							
	上海市食品卫生 监督检验所		上海卫生检疫局			上海长宁区 卫生防疫站		广东省食品卫生监督检验所		
样品名称	可乐型 饮料	即溶咖啡	可乐型 饮料	即溶咖啡	茶 叶	可乐型 饮料	即溶咖啡	可乐型 饮料	即溶咖啡	茶 叶
样品件数,件	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
测定次数 次/件	10	10	5	5	10	5	5	5	5	5
标准差 S	0.262 7 ~ 0.527 5	4.118 7	1.741	—	12.382	1.12	59.2'	3.231	—	10.228
相 对 标 准 差 $CV, \%$	0.39 ~ 2.55	3.67	1.64	—	0.49	1.85	1.92	3.16	—	0.39
回收率, %	95.6 ~ 101.8	90.1 ~ 99.9	95.0 ~ 97.9	98.5 ~ 100.1	—	95.8 ~ 104.2	96.8 ~ 103.4	94.6 ~ 97.89	94.4 ~ 98.08	—
标准曲线 相关系数	0.999 2~0.999 9 ($n=10$)		0.999 6~0.999 9($n=5$)			0.999 7~0.999 9 ($n=5$)		0.998 6~0.999 8($n=5$)		

表 A2 高效液相色谱法研制及验证结果

单 位	研 制 单 位			验 证 单 位				
	上海卫生检疫局			上海市食品卫生监督检验所			上海长宁区卫生防疫站	
样品名称	可乐型饮料	咖 啡	新 茶	可乐型饮料	天然咖啡	茶 叶	可乐饮料	即溶咖啡
样品件数,件	2	1	1	3	1	1	1	1
测定次数 次/件	5	5	5	5	10	5	5	5

表 A2(完)

单 位	研 制 单 位			验 证 单 位				
	上海卫生检疫局			上海市食品卫生监督检验所			上海长宁区卫生防疫站	
样品名称	可乐型饮料	咖 啡	新 茶	可乐型饮料	天然咖啡	茶 叶	可乐饮料	即溶咖啡
标准差 <i>S</i>	0.331 7 ~ 1.332 3	28.30	22.34	—	119.11	46.60	1.33	70.14
相对标准差 <i>CV</i> %	0.49 ~ 1.36	0.73	0.85	—	3.19	1.71	1.22	1.52
回收率, %	91.91 ~ 104.25	94.34 ~ 105.75	—	96.0 ~ 105.9	93.2 ~ 98.3	93.8 ~ 99.6	95.7 ~ 105.7	96.7 ~ 104.4
标准曲线相 关系数	0.999 7~0.999 9(<i>n</i> =5)			0.999 6~0.999 8(<i>n</i> =5)			0.999 1~0.999 9(<i>n</i> =5)	

A2 方法评价

紫外分光光谱法和高效液相色谱法,方法简单,快速稳定、准确、灵敏度高、干扰物排除能力强,适用于各层次实验室对饮料中咖啡因含量的测定。