

## OZNACZANIE KOFEINY W NAPOJACH BEZALKOHOLOWYCH METODĄ HPLC Z WYKORZYSTANIEM RÓŻNYCH SPOSOBÓW PRZYGOTOWANIA PRÓBEK

**Maria Białas, Hanna Łuczak, Małgorzata Brzozowska**  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego w Warszawie  
Oddział Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych  
61-361 Poznań, ul. Starołęcka 40  
bialas@man.poznan.pl

### Streszczenie

Oznaczono zawartość kofeiny w wybranych napojach bezalkoholowych, typu cola i energetyzujących, metodą HPLC z zastosowaniem dwóch procedur wg PN-ISO 10095:1997 i ISO 20481:2008, różniących się sposobami przygotowania próbek do analizy. W celu porównania wyników otrzymanych tymi procedurami określono ich precyzję i dokładność. Przeprowadzono również testy statystyczne, które potwierdziły, że obie procedury nie różnią się istotnie pod względem precyzji (test *F-Snedecora*) oraz wykazały brak istotnych różnic pomiędzy średnimi wynikami (test *t-Studenta*).

Stwierdzono, że obie procedury cechują się wysoką precyzją i dokładnością oraz, że sposób przygotowania próbki w procedurze wg ISO 20481:2008 znacznie skraca czas wykonywania analizy, a także zmniejsza zużycie odczynników i materiałów pomocniczych w porównaniu do procedury wg PN-ISO 10095:1997.

**Słowa kluczowe:** kofeina, oznaczanie kofeiny, HPLC, napoje bezalkoholowe, napoje energetyzujące

### DETERMINATION OF THE CAFFEINE CONTENT IN SOFT DRINKS BY HPLC METHOD USING DIFFERENT WAYS OF PREPARING SAMPLES

#### Summary

Caffeine content in chosen soft drinks (cola type and energy drinks) was determined by HPLC method using two different ways of preparing samples for analysis based on Polish and ISO standards.

In the order to compare the results of both procedures, precision and accuracy were determined and statistical tests were carried out (Student's test and F-Snedecor's test).

There was found that both procedures were characterized by high precision and accuracy and there were no essential differences between obtained average results.

The way of preparing samples using ISO standard method significantly reduced time of analysis and the quantity of using reagents and materials to compare Polish standard method.

**Key words:** caffeine, caffeine determination, HPLC, soft drinks, energy drinks

## WSTĘP

Przeprowadzone w kwietniu 2010 roku przez Millword/Brown SMG/KRC badania wykazują, że obecnie wśród preferowanych przez Polaków napojów, obok wody i soków znajdują się napoje bezalkoholowe, które pije kilka razy w tygodniu ponad połowa konsumentów [Anonim 2010].

Do grupy napojów bezalkoholowych należą, między innymi, napoje zawierające w swoim składzie biologicznie aktywną kofeinę. Napoje typu cola zawierają względnie niewielką ilość kofeiny (około 10 mg/100 ml), należy jednak zaznaczyć, że spożywane są również przez dzieci. Większe ilości kofeiny zawierają napoje energetyzujące (około 30 mg/100 ml). Dostępne są one na rynku w szerokim asortymencie i należą do środków specjalnego przeznaczenia dla osób dorosłych. Kofeina zawarta w tych napojach powoduje zwiększenie koncentracji, poprawę pamięci, zmniejszenie senności i uczucia zmęczenia. Jednak napoje zawierające znaczne ilości kofeiny nie są wskazane dla dzieci, kobiet ciężarnych i osób, które mają problemy z układem krążenia, gdyż podnoszą ciśnienie i zwiększają ryzyko zawału serca. [Kostyra i in. 2009; Sikora 2008; Wierzejska, Jarosz 2003; Witkowska i in. 2011].

W wydanej 2002 roku dyrektywie Unia Europejska określiła, że wszystkie napoje zawierające kofeinę (oprócz herbaty i kawy) w ilości powyżej 150 mg/l muszą posiadać na etykiecie informację „wysoka zawartość kofeiny” [Anonim 2006]. Zawartość kofeiny w napojach typu cola według aktualnych norm na napoje bezalkoholowe (PN-A-79032:1993 i PN-A-79035:1994) nie może przekraczać 15 mg w 100 ml, natomiast w napojach energetyzujących nie może być wyższa niż ilość deklarowana przez producenta na opakowaniu [Hoffman, Świdorski 2008; Stasiuk, Rój 2006; Wierzejska i in. 2002].

W świetle przedstawionych informacji, potrzebna jest kontrola zawartości kofeiny w napojach bezalkoholowych zawierających ten składnik.

Istnieje wiele metod analitycznych ilościowego oznaczania kofeiny w produktach spożywczych. W aktualnej normie określającej metody badań napojów bezalkoholowych (PN-A-79033:1993) proponowana jest metoda jodometryczna (miareczkowa) Prange-Walthera. Obecnie powszechnie stosowaną metodą oznaczania kofeiny w produktach spożywczych jest metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). W związku

z tym w pracy podjęto próby oznaczenia kofeiny w napojach bezalkoholowych tą metodą w oparciu o normy przystosowane do oznaczania tego związku w kawach i w produktach kawowych.

Celem pracy było porównanie dwóch procedur oznaczania zawartości kofeiny w napojach bezalkoholowych metodą HPLC różniących się sposobami przygotowania próbek do analizy. Porównano procedury zawarte w normach PN-ISO 10095:1997 [9] i ISO 20481:2008 [4] i określono na podstawie analizy statystycznej, czy wyniki uzyskane według tych procedur różnią się w sposób istotny.

### **MATERIAŁ I METODY BADAŃ**

Materiał do badań stanowiły zakupione w handlu próbki napojów bezalkoholowych o różnej zawartości kofeiny. Badania wykonano w 1 napoju typu cola i w 2 napojach energetyzujących.

Zawartość kofeiny w napojach oznaczono metodą HPLC według dwóch procedur z różnymi sposobami przygotowania próbek:

- procedura A – według normy PN-ISO 10095:1997
- procedura B - według normy ISO 20481:2008.

W tabeli 1 przedstawiono przebieg postępowania analitycznego w procedurze A i B. W obu postępowaniach analitycznych przeprowadzono wodną ekstrakcję kofeiny z próbki w obecności tlenku magnezu w temperaturze 90 °C. Do oczyszczania próbki w procedurze A wykorzystano mikrokolumnę krzemionkową (3 ml), roztwór oczyszczający - woda amoniakalna/metanol oraz roztwór wymywający kofeinę - mieszaninę metanol/woda/kwas octowy, natomiast w procedurze B wykorzystano do oczyszczania badanego ekstraktu tylko filtr strzykawkowy 0,45µm. Przygotowane próbki analizowano za pomocą chromatografu cieczowego firmy Dionex, wyposażonego w detektor UV (długość fali 272 nm). Jako wzorca użyto czystą, bezwodną kofeinę (1,3,7-trimetylo-2,6-dioksy purynę-C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), z której wykonano roztwór wzorcowy kofeiny o stężeniu 0,5 g/l. Z tego roztworu przygotowywano roztwory robocze kofeiny; w procedurze A – 0,01 g/l i w procedurze B – 0,004 g/l.

Zawartość kofeiny w próbce (W) wyrażoną w mg/100ml obliczono wg wzoru:

$$W = \frac{A_x \times c_1 \times V \times 100 \times 1000}{A_c \times m}$$

gdzie:

- $A_x$  jest polem piku kofeiny otrzymanego dla roztworu badanego
- $A_c$  jest polem piku kofeiny otrzymanego dla roztworu wzorcowego kofeiny
- $c_1$  jest stężeniem roztworu wzorcowego kofeiny w gramach na litr
- $m$  jest objętością próbki analitycznej w mililitrach
- $V$  jest rozcieńczeniem próbki w zależności od postępowania analitycznego wyrażona w litrach (procedura A – 0,1; procedura B - 0,25)
- 1000 jest współczynnikiem przeliczeniowym gramów na miligramy
- 100 jest współczynnikiem przeliczeniowym zawartości kofeiny na 100 ml produktu

W celu porównania powtarzalności otrzymanych wyników uzyskanych według procedur A i B obliczono: średnią arytmetyczną ( $\bar{x}_{sr}$ ), odchylenie standardowe ( $sr$ ), współczynnik zmienności ( $cv\%$ ) oraz przeprowadzono test jednorodności dwóch wariancji ( $F$ -Snedecora) i test istotności różnicy między wartościami średnimi ( $t$ -Studenta), a dokładność sprawdzono metodą odzysku.

**Tabela 1.** Schemat postępowania analitycznego w procedurze A i B  
*Scheme of analytical procedure A and B*

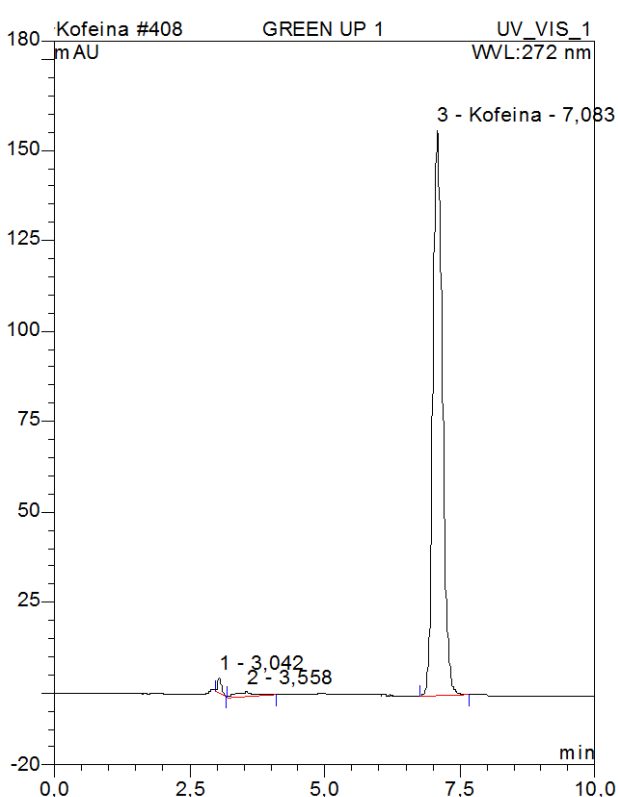
<b>Procedura A</b> <b>wg PN-ISO 10095:1997</b>	<b>Procedura B</b> <b>wg ISO 20481:2008</b>
W obu postępowaniach analitycznych przeprowadzono ekstrakcję kofeiny z próbki wodą o temperaturze 90°C w obecności tlenku magnezu; po oczyszczeniu ekstraktu oznaczano zawartości kofeiny za pomocą HPLC z detekcją w nadfiolecie	
<b>Sposób przygotowania próbek do analizy</b>	
Napoje odgazowano poprzez podgrzanie w otwartym naczyniu do temperatury 25°C i intensywne mieszanie około 5 minut.	
Ekstrakcja kofeiny z próbki	
Do kolby z próbką w ilości 10 ml dodano 90 ml wody, całość zważono i wytrząsano w temperaturze 90°C przez 20 minut w obecności tlenku magnezu, ochłodzono i ponownie zważono (masy kolby przed i po ogrzewaniu powinny być równe)	Próbkę napoju w ilości 10 ml wytrząsano z 200 ml wody w kolbie pomiarowej o pojemności 250 ml w temperaturze 90°C przez 20 minut w obecności tlenku magnezu, ochłodzono i dopełniono wodą
Ekstrakt przesączono przez sączek z bibuły	Ekstrakt dekantowano
Oczyszczanie próbek	
10 ml ekstraktu oczyszczano na mikrokolumnie krzemionkowej (3ml) modyfikowanej grupami fenylowymi poprzez zastosowanie roztworu oczyszczającego (woda amoniakalna/metanol), a następnie wymywano kofeinę roztworem (metanol/woda/kwas octowy) do kolbki miarowej pojemności 10 ml i dopełniono wodą	Część ekstraktu oczyszczano stosując filtr strzykawkowy 0,45 µm
<b>Analiza chromatograficzna</b>	
Roztwory wzorcowe - z roztworu podstawowego o stężeniu kofeiny 0,5 g/l przygotowano roztwory wzorcowe kofeiny (robocze)	
0,01 g/l	0,004 g/l
Faza ruchoma - metanol w ilości 300 ml przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 1000 ml i dopełniono wodą	
Do analizy chromatograficznej przeniesiono do fiolek około 1ml badanego roztworu lub roztworu wzorcowego, które umieszczono w automatycznym podajniku próbek; kolumnę Supelcosil LC – 18 – DB o wymiarach 250 mm x 4,6 mm, 5 µm z kolumnką zabezpieczającą LC-18 termostatowano w temperaturze 30°C±1°C; zastosowano natężenie przepływu fazy ruchomej przez kolumnę 1 ml/min; próbki dozowano w objętości 20 µl; analizę prowadzono przy długości fali 272 nm; ustalono czas retencji kofeiny według analizy wzorca i po ustabilizowaniu przepływu fazy ruchomej i temperatury wykonano analizę	

## WYNIKI I DYSKUSJA

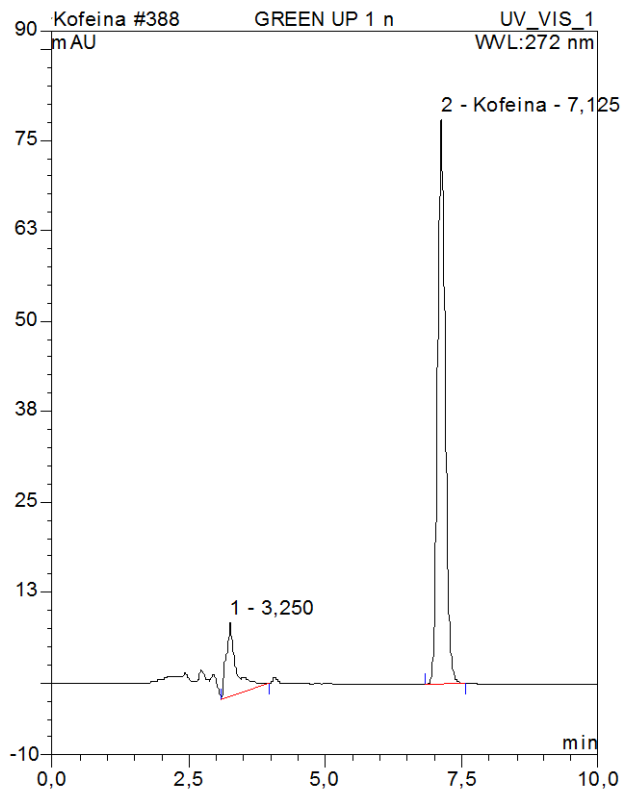
Wyniki oznaczania zawartości kofeiny w napojach bezalkoholowych typu cola i energetyzujących otrzymane wg procedur A i B przedstawiono w tabeli 2.

Średnie zawartości kofeiny ( $x_{sr}$ ) oznaczone badanymi procedurami były zbliżone i wynosiły dla napoju typu cola w procedurze A - 10,22 mg/100 ml i w procedurze B - 10,31 mg/100ml oraz odpowiednio dla napoju energetyzującego „1” 30,40 mg/100 ml i 30,32mg/100 ml, a dla napoju energetyzującego „2” 31,72 mg/100ml i 31,82 mg/100 ml. Niskie wartości współczynników zmienności ( $cv$ ) wynoszące od 0,45 do 1,06% wskazują na porównywalną i wysoką precyzję obu procedur zarówno w odniesieniu do napojów typu cola, jak i energetyzujących.

W oparciu o uzyskane chromatogramy kofeiny stwierdzono, że w obu procedurach A i B pik kofeiny był bardzo wyraźnie rozdzielony, pomimo zastosowanych różnych sposobów oczyszczania badanego ekstraktu (Rysunek 1 i 2).



**Rysunek 1.** Przykład chromatogramu kofeiny oznaczonej w próbce napoju energetyzującego wg procedury A  
*Chromatogram example of caffeine determination using procedure A in sample of energy drink*



**Rysunek 2.** Przykład chromatogramu kofeiny oznaczonej w próbce napoju energetyzującego wg procedury B  
*Chromatogram example of caffeine determination using procedure B in sample of energy drink*

**Tabela 2.** Zawartość kofeiny w napojach bezalkoholowych typu cola i w napojach energetyzujących

*Caffeine content in soft drinks - cola type and energy drinks*

Napoje bezalkoholowe	Procedura A	Procedura B
	wg PN-ISO 10095:1997	wg ISO 20481:2008
	Zawartość kofeiny (mg/100 ml)	
typu cola	10,21	10,46
	10,17	10,43
	10,13	10,42
	10,18	10,22
	10,21	10,21
	10,27	10,26
	10,28	10,25
	10,29	10,21
$x_{\bar{s}r}$	<b>10,22</b>	<b>10,31</b>
$sr$	<b>0,058</b>	<b>0,109</b>
$cv[\%]$	<b>0,57</b>	<b>1,06</b>
napój energetyzujący „1”	30,49	30,86
	30,49	30,22
	30,42	30,05
	30,37	30,31
	30,37	30,19
	30,59	30,27
	29,99	30,32
	30,44	30,33
$x_{\bar{s}r}$	<b>30,40</b>	<b>30,32</b>
$sr$	<b>0,179</b>	<b>0,237</b>
$cv[\%]$	<b>0,59</b>	<b>0,78</b>
napój energetyzujący „2”	31,75	31,84
	31,45	31,97
	31,93	31,97
	31,96	31,67
	31,79	31,58
	31,67	31,81
	31,55	31,94
	31,66	31,79
$x_{\bar{s}r}$	<b>31,72</b>	<b>31,82</b>
$sr$	<b>0,175</b>	<b>0,142</b>
$cv[\%]$	<b>0,55</b>	<b>0,45</b>

$x_{\bar{s}r}$  - wartość średnia,  $sr$  - odchylenie standardowe,  $cv$  - współczynnik zmienności

$x_{\bar{s}r}$  - average value,  $sr$  - standard deviation,  $cv$  - coefficient of variation

Dokładność obu postępowań analitycznych A i B oceniono poprzez wyznaczenie odzysku, który wynosił od 96,0 do 98,0 % w procedurze A i od 98,3 do 102,7% w procedurze B i świadczy o wysokiej dokładności stosowanych procedur (Tabela 3).

**Tabela 3.** Odzysk kofeiny w napojach bezalkoholowych typu cola i w napojach energetyzujących  
*Caffeine recovery in soft drinks - cola type and energy drinks*

Napoje bezalkoholowe	Oznaczona średnia zawartość kofeiny w napoju, (mg/100 ml)	Oznaczona średnia zawartość kofeiny w napoju z dodatkiem kofeiny, (mg/100 ml)	Dodatek kofeiny, (mg/100 ml)	Średni odzysk, (%)
<b>Procedura A</b> wg PN-ISO 10095:1997				
typu cola	10,22	58,22	50,00	96,0
napój energetyzujący „1”	30,40	38,10	8,00	96,3
napój energetyzujący „2”	31,72	56,22	25,00	98,0
<b>Procedura B</b> wg ISO 20481:2008				
typu cola	10,21	34,78	25,00	98,3
napój energetyzujący „1”	30,32	40,59	10,00	102,7
napój energetyzujący „2”	31,82	56,67	25,00	99,4

Porównano również wyniki oznaczeń kofeiny w badanych napojach bezalkoholowych, uzyskanych wg procedur A i B przy pomocy testu jednorodności dwóch wariancji (*F-Snedecora*) oraz testu istotności różnicy między wartościami średnimi (*t-Studenta*).

Wyniki testu *F-Snedecora* świadczą o braku statystycznie istotnych różnic precyzji obu testowanych postępowań analitycznych, a wyniki testu *t-Studenta* o identyczności dwóch średnich uzyskanych badanymi procedurami (Tabela 4).



**Tabela 4.** Porównanie parametrów charakteryzujących procedury A i B oznaczania kofeiny w napojach bezalkoholowych  
*Comparison of characteristic parameters of caffeine determination in soft drinks for procedure A and B*

Parametr	$n$	$x_{sr}$	$sr$	$(sr)^2$	$cv$ (%)	Test <i>F-Snedecora</i>	Test <i>t-studenta</i>
napój typu cola							
Procedura A	8	10,218	0,058	0,003364	0,57	obliczona 3,53 z tablic	obliczona 2,04 z tablic
Procedura B	8	10,307	0,109	0,011881	1,06	3,53 < 3,79	2,04 < 2,15
napoje energetyzujące „1” i „2”							
Procedura A	16	31,058	0,177	0,03133	0,57	obliczona 1,21 z tablic	obliczona 0,18 z tablic
Procedura B	16	31,070	0,195	0,03803	0,63	2,40 1,21 < 2,40	2,04 0,18 < 2,04

$n$  - liczba powtórzeń,  $x_{sr}$  - wartość średnia,  $sr$  - odchylenie standardowe,  $cv$  - współczynnik zmienności  
 $n$  - number of repeats,  $x_{sr}$  - average value,  $sr$  - standard deviation,  $cv$  - coefficient of variation

Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń kofeiny, stwierdzono że zastosowany w procedurze A sposób oczyszczania próbki na mikrokolumnie krzemionkowej z wykorzystaniem roztworu oczyszczającego - woda amoniakalna/metanol i roztworu wymywającego - mieszaniny metanol/woda/kwas octowy, wydłuża czas analizy o około 40% oraz zwiększa zużycie odczynników i materiałów pomocniczych w porównaniu do sposobu przygotowania próbki w procedurze B wykorzystującego filtr strzykawkowy 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### WNIOSKI

1. Wyniki oznaczania zawartości kofeiny metodą HPLC wskazują, że do oznaczania tego składnika w napojach bezalkoholowych mogą być stosowane oba sposoby przygotowywania próbek zawarte w procedurze A (wg PN-ISO 10095:1997) i w procedurze B (wg ISO 20481:2008).
2. Obydwie oceniane procedury cechują się brakiem statystycznie istotnych różnic precyzji (test *F-Snedecora*) oraz brakiem różnic pomiędzy średnimi wynikami (test *t-Studenta*) i dużą dokładnością.

3. Do oznaczania kofeiny w napojach bezalkoholowych zaleca się stosowanie procedury B (wg ISO 20481:2008) równie precyzyjnej i dokładnej jak procedura A (wg PN-ISO 10095:1997), jednak korzystniejszej ze względów ekonomicznych i ekologicznych.

### **PIŚMIENNICTWO**

1. Anonim.( 2010). Jakie napoje piją Polacy. Przem. Spoż. 6, 41
2. Anonim. ( 2006). Prawo żywnościowe. Ostrzeżenie o kofeinie na etykietach. Przem. Ferm. i Owoc.–Warz., 5, 32
3. Hoffman M., Świdorski F.(2008). Napoje energetyzujące i ich składniki funkcjonalne. Przem. Spoż. 9, 8-13
4. ISO 20481:2008 Coffee and coffee products – determination of the caffeine content using high performance liquid chromatography (HPLC) - Reference method
5. Kostyra E., Świdorski F., Żebrowska M.(2009). Charakterystyka jakości sensorycznej i stopnia akceptacji konsumenckiej wybranych napojów energetyzujących. Post. Tech. Przetw. Spoż. 1, 24-28
6. PN – A -79032:1993 Napoje bezalkoholowe gazowane
7. PN – A -79033:1985 Napoje bezalkoholowe. Pobieranie próbek i metody badań
8. PN – A -79035:1994 Napoje bezalkoholowe niskogazowane
9. PN-ISO 10095:1997 Kawa. Oznaczanie zawartości kofeiny. Metoda wykorzystująca wysokosprawną chromatografię cieczową,
10. Sikora E. (2008). Napoje energetyzujące – korzyści i zagrożenia. Przem. Ferm. i Owoc. – Warz. nr 3, s.8
11. Stasiuk E., Rój A.(2006). Zawartość kofeiny w napojach energetyzujących. W: XXXVII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności PAN – Doskonalenie jakości żywności i żywienia w perspektywie potrzeb konsumenta XXI wieku. 26-27 wrzesień 2006. Gdynia
12. Wierzejska R. i in.(2002) Napoje energetyzujące – ich skład i przeznaczenie. Przem. Spoż., 10, 42-45
13. Wierzejska R., Jarosz M.(2003) Kofeina a zdrowie. Żyw. Człow. Metabol. XXX, 3/4, 1234-1241
14. Witkowska A. i in. (2011) Właściwości przeciwutleniające napojów energetyzujących. Bromat. Chem. Toksykol. XLIV, 3, 355-360