



**NORMA MEXICANA**

**NMX-F-182-SCFI-2011**

**CAFÉ - DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA -  
MÉTODO POR CROMATOGRFIA LÍQUIDA DE ALTA  
RESOLUCION (MÉTODO DE REFERENCIA)**

**COFFEE - DETERMINATION OF CAFFEINE CONTENT - METHOD  
USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY  
(REFERENCE METHOD)**



## PREFACIO

En la elaboración de la presente norma mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

- AGROINDUSTRIAS UNIDAS DE MÉXICO, S.A DE C. V.
- ASOCIACIÓN MEXICANA DE LA CADENA PRODUCTIVA DEL CAFÉ, A.C. (AMECAFÉ).
- ASOCIACIÓN MEXICANA DE EXPORTADORES DE CAFÉ, A. C.
- ASOCIACIÓN NACIONAL DE LA INDUSTRIA DEL CAFÉ, A.C.
- CAFÉ TOSTADO DE EXPORTACIÓN, S.A. DE C.V.
- CAFINCO, S.A, DE C. V.
- CAFIVER, S.A DE C. V.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL PARA CAFÉ Y SUS PRODUCTOS
- DESCAFEINADORES MEXICANOS, S. A. DE C. V.



- NESTLÉ MÉXICO, S.A. DE C.V.
  
- INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS (INIFAP).
  
- SABORMEX, S. A DE C. V.
  
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN (SAGARPA).  
Subsecretaría de Agricultura. Dirección General de Fomento a la Agricultura.
  
- SECRETARÍA DE ECONOMÍA.  
Dirección General de Normas.



## INDICE DEL CONTENIDO

<b>Número del Capítulo</b>		<b>Página</b>
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	1
2	PRINCIPIO	1
3	REACTIVOS	2
4	APARATOS Y MATERIALES	3
5	PROCEDIMIENTO	5
6	EXPRESION DE LOS RESULTADOS	8
7	INFORME DE LA PRUEBA	11
8	VIGENCIA	11
9	BIBLIOGRAFÍA	11
10	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	13



## **NMX-F-182-SCFI-2011**

### **CAFÉ - DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CAFEÍNA - MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION (MÉTODO DE REFERENCIA)**

### **COFFEE - DETERMINATION OF CAFFEINE CONTENT - METHOD USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (REFERENCE METHOD)**

#### **1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN**

Esta norma mexicana describe el método de prueba para la determinación de cafeína por el método por cromatografía líquida de alta resolución (método de referencia).

Aplica a café verde, café tostado, café soluble regular o descafeinado, así como productos de café instantáneo (por ejemplo, mezclas de café/achicoria o bebida de café tipo cappuccino).

#### **2 PRINCIPIO**

La cafeína es extraída de las muestras con agua a 90°C en presencia de óxido de magnesio. Después de filtrar, el contenido de cafeína es determinado por HPLC en una columna RP-18 con elución isocrática, detector UV a 272 nm aproximadamente.



Siempre que sea necesario, el contenido de cafeína debe estar reportado en base seca, para lo cual se requiere la determinación de humedad mediante un método estándar adecuado.

### 3 REACTIVOS

Usar solo reactivos de reconocido grado analítico a menos que sea especificado de otra manera, agua destilada desmineralizada y filtrada y soluciones desgasificadas.

A menos que se especifique lo contrario, utilizar únicamente los reactivos con grado analítico reconocido. El agua usada debe ser agua destilada o de pureza equivalente.

3.1 Metanol, grado HPLC

3.2 Óxido de magnesio, pesado, extra-puro

**NOTA 1.-** El uso de MgO es importante para la vida útil de la columna analítica, especialmente para café verde. La cantidad de MgO utilizada depende del equipo y tipo de producto.

3.3 Cafeína, (1,3,7-trimetilxantina, 1,3,7,-trimetil-1H-purina-2,6(3H,7H)-diona; metilteobromina,  $C_8H_{10}N_4O_2$ ), pura anhidra

3.4 Fase Móvil, 24% (v/v) de metanol en agua.

Transferir 240 mL de metanol en un matraz volumétrico de 1 L.  
Diluir a volumen con agua, mezclar y filtrar a través de un filtro 0,45  $\mu$ m.

**NOTA 2.-** Al cambiar la relación de metanol en agua, el tiempo de retención de cafeína puede ser ajustado para optimizar la separación cromatográfica en la columna.

#### 3.5 Soluciones estándares de cafeína

3.5.1 Solución estándar stock, corresponde a 200 mg/L

Pesar (0,200  $\pm$  0,001) g de cafeína anhidra en un matraz volumétrico de 1 L. Añadir suficiente agua caliente hasta llenar la mitad del matraz. Agitar para



disolver la cafeína, enfriar a temperatura ambiente, diluir a volumen con agua y mezclar.

Esta solución es estable a 4°C por un mes. Almacenar en refrigeración.

**3.5.2** Soluciones estándares diluidas para café regular, corresponde a 40 mg/mL aproximadamente.

Pipetear 50 mL de la solución estándar stock de cafeína en un matraz volumétrico de 250 mL. Diluir a volumen con agua y agitar. Preparar solución estándar diluida diariamente.

**3.5.3** Soluciones estándares diluidas para café descafeinado, corresponde a 4 mg/mL aproximadamente.

Pipetear 5 mL de la solución estándar stock de cafeína en un matraz volumétrico de 250 mL. Diluir a volumen con agua y agitar. Preparar solución estándar diluida diariamente.

### **3.6 Curva de calibración**

El uso de tres o cinco puntos de calibración es opcional. Se recomienda un intervalo de concentración de 5 mg/L a 25 mg/L para café regular y 0,5 mg/L a 2,5 mg/L para café descafeinado.

## **4 APARATOS Y MATERIALES**

**4.1** Balanza analítica, capacidad de pesado con una precisión de  $\pm$  0,1 mg.

**4.2** Filtros de membrana, tamaño de poro 0,45  $\mu$ m, para filtración de fases móviles y extractos de muestra.

**4.3** Cromatógrafo líquido de alta resolución, equipado para elución isocrática, con detector ultravioleta/visible, con longitud de onda fija a 272 nm (270 – 280 nm) o un filtro del detector (254 nm) y sistema de recolección de datos e integrador. El uso del degasificador es opcional.

**4.4** Columna cromatográfica para HPLC, una longitud mínima de 125 mm, empacada con material C18, preferentemente



partículas esféricas de 5  $\mu\text{m}$ , con una eficiencia de separación, de al menos, 5000 platos teóricos. El número de platos teóricos,  $N_{th}$ , de una columna puede ser calculado mediante la determinación de la forma del pico después de la inyección de la solución estándar con la siguiente ecuación:

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

Donde:

- tr es el tiempo de retención en segundos, del pico.
- b es el ancho de pico, en segundos a la mitad de la altura del pico
- 4.5** Licuadora con rueda dentada, con chaqueta de enfriamiento o molino analítico con aspas y chaqueta de enfriamiento, o cualquier otro molino para grano de café.
- 4.6** Criba tejida de tela de alambre con un tamaño de orificio de 630  $\mu\text{m}$ .
- 4.7** Filtros de membrana, tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ , para filtración de fases móviles y extractos de muestra.
- 4.8** Baño maría, capacidad de operación a 90°C  $\pm$  1°C con agitación continua.
- 4.9** Balanza analítica, con exactitud de 0,000 1 g.
- 4.10** Botella de 250 mL de capacidad, con tapa de rosca.
- 4.11** Matraces volumétricos de 10 mL, 50 mL, 100 mL, 2150 mL, 2 000 mL de capacidad.
- 4.12** Pipetas de 2 mL, 5mL, 10 mL, y 50 mL de capacidad.
- 4.13** Material y equipo común de laboratorio.





- 4.14 Baño ultrasónico.
- 4.15 Micro-jeringa.
- 4.16 Molino de café, adecuado para molienda de granos de café tostado.
- 4.17 Tamiz, tamaño nominal de la apertura 630  $\mu\text{m}$ .
- 4.18 Matraz volumétrico, capacidad de 250 mL y 1 L.

## 5 PROCEDIMIENTO

### 5.1 Preparación de la muestra de prueba

#### 5.1.1 Café Verde

Moler los granos de café verde, de tal manera que más del 50% de la fracción masa de la muestra pase a través del tamiz. Después tomar la muestra y mezclar perfectamente el café molido.

#### 5.1.2 Café Tostado

Moler los granos de café tostado, de tal manera que más del 50% de la fracción masa de la muestra pase a través del tamiz.

Usar el café tostado molido de empaques comerciales sin un tratamiento adicional excepto homogeneización.

#### 5.1.3 Café Soluble

No se requiere moler el café soluble.

#### 5.1.4 Bebidas mezcladas

Homogeneizar las bebidas en polvo usando el molino inmediatamente antes de la extracción para prevenir segregación. En caso de bebidas en polvo, 50 g de producto es requerido como mínimo (para empaques en porciones: un mínimo de 5 porciones).



## 5.2 Determinación del contenido de materia seca

Para calcular el contenido de cafeína en base seca, debe ser determinado el contenido de humedad en una porción de la muestra.

Para otros tipos de café y productos derivados del café, la determinación del contenido de materia seca debe ser sujeta al acuerdo de las partes interesadas.

### 5.3 Porción de prueba

#### 5.3.1 Café verde y tostado

Pesar (5.1)  $1 \pm 0,001$  g de la muestra y transferir a un matraz volumétrico de 250 mL

#### 5.3.2 Café instantáneo

Pesar (5.1)  $0,5 \pm 0,001$  g de la muestra y transferir a un matraz volumétrico de 250 mL.

#### 5.3.3 Bebidas mezcladas

Pesar (5.1)  $1 \pm 0,001$  g de la muestra y transferir a un matraz volumétrico de 250 mL.

### 5.4 Extracción de cafeína.

5.4.1 Añadir a la muestra (5.3.1, 5.3.2 o 5.3.3) en el matraz, 5 g de óxido de magnesio (3.2) y 200 mL de agua.

5.4.2 Colocar el matraz en un baño de agua a temperatura de ebullición y esperar hasta que la solución alcance al menos 90°C. Continuar calentando el matraz en un baño de agua por 20 min., mezclar ocasionalmente con agitación.

5.4.3 Remover el matraz volumétrico del baño de agua, enfriar hasta temperatura con agua del grifo, y diluir a volumen con agua. Esperar hasta que los sólidos se sedimenten.



**5.4.4** Tomar una alícuota del sobrenadante y filtrar a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ ; descartar los primeros mililitros.

**5.4.5** El filtrado está listo para la separación por HPLC.

## **5.5 Determinación (Análisis HPLC)**

### **5.5.1 Ajuste del equipo**

La fase móvil debe ser degasificada por 20 min. en un baño ultrasónico o debe purgarse con helio antes de usarla. Si el equipo HPLC incluye un degasificador, 10 min. son suficientes.

Ajustar el cromatógrafo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y establecer las siguientes condiciones de operación:

- a) Flujo de la fase móvil 1,0 mL/min;
- b) Detector UV a 272 nm (o 254 nm en caso del filtro del detector). Asegurar que el intervalo de sensibilidad del detector se ajuste al pico de la solución estándar. En caso de más de un estándar, seleccionar el más alto.

### **5.5.2 Medición**

Una vez que el flujo de la fase móvil y la presión correspondiente son estables, permitir al sistema equilibrar por lo menos 10 min. Entonces inyectar 10  $\mu\text{L}$  de la solución estándar usando la micro jeringa, dentro de la columna en la próxima corrida seguida de un volumen igual del extracto de la muestra. Cuando se utiliza una solución estándar sencilla, inyectar en intervalos regulares (normalmente después de seis muestras).

Después de una serie analítica, enjuague el sistema cromatográfico y la columna con 50% (v/v) de metanol y agua. Colocar sellos en la columna si es desconectada para almacenamiento.



## 6 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

### 6.1 Contenido de cafeína en la muestra

El cálculo del contenido de cafeína,  $w_c$ , expresado como por ciento masa, numéricamente equivale a gramos por 100 g de café, se realiza de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

Donde:

$A_{st}$  es el área, en unidades de área, del pico de cafeína de la solución estándar de cafeína

$A_s$ , es el área, en unidades de área, del pico de cafeína de la solución de la muestra

$M_s$  es la masa, en gramos de la muestra

$V$  es el volumen, en litros, de la solución de la muestra extraída, ( $V=0,25$  L)

$\rho_{st}$  es la concentración, en gramos por litro, de la solución estándar de cafeína.

**NOTA 3.-** La altura del pico puede ser utilizada como alternativa al área pico

Si más de un estándar de calibración es utilizado, graficar la curva de calibración para los estándares de cafeína, para obtener los valores de la pendiente y el intercepto. Usar la gráfica de calibración para calcular la concentración de cafeína en la muestra.

Calcular el promedio aritmético de dos determinaciones por duplicado realizadas bajo condiciones de repetibilidad.



**6.2** Determinación opcional del contenido de cafeína en la muestra en materia seca.

El cálculo del contenido de cafeína,  $w'_c$ , expresado como por ciento masa, numéricamente equivale a gramos por 100 g de café, se realiza de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$w'_c = \frac{A_s \rho_{st} V \times 100}{A_{st} m_s w_d} = \frac{A_s \rho_{st} \times 25}{A_{st} m_s w_d}$$

Donde:

$W_d$  es el contenido de materia seca en la muestra (gramos por 100g).

Calcular el promedio aritmético de dos determinaciones por duplicado realizadas bajo condiciones de repetibilidad.

**6.3** Repetibilidad y reproducibilidad

Detalles de pruebas inter-laboratorios para determinar la precisión del método se resumen en el anexo A de la Norma Internacional ISO 20481:2008 (véase 9 Bibliografía).

Los valores derivados de la prueba interlaboratorio sólo aplican a los indicados en la tabla (véase tabla 1).



Tabla 1.- Datos de precisión.

Muestra/Producto	Promedio % fracción masa	Límite de Repetibilidad r % fracción masa	Límite de Reproducibilidad R % fracción masa
<b>Café Verde</b>			
Descafeinado	0,057	0,004	0,009
Descafeinado	0,075	0,003	0,006
Regular arábica	1,14	0,05	0,15
Regular robusta	2,18	0,096	0,37
<b>Café tostado</b>			
Descafeinado	0,055	0,007	0,026
Mezcla Regular/Descafeinado	0,642	0,054	0,091
Regular	1,22	0,053	0,176
<b>Bebida de café en polvo</b>			
Tipo Capuchino	0,403	0,024	0,068
<b>Café Soluble</b>			
Descafeinado	0,072	0,004	0,024
Descafeinado	0,109	0,008	0,030
Regular liofilizado	2,51	0,050	0,23
Regular aglomerado	3,19	0,085	0,372
<b>Mezcla Soluble</b>			
Café/Achicoria	2,45	0,066	0,216

### 6.3.1 Repetibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados sencillos e independientes, obtenidos usando el mismo método, con materiales idénticos, en el mismo laboratorio, realizado por los mismos analistas, usando el mismo equipo dentro de un corto intervalo de tiempo, no debe ser mayor a los límites de repetibilidad,  $r$ , indicados en la tabla (véase tabla1) en más del 5% de los casos (por ejemplo, repetibilidad al 95% de nivel de confianza).



### 6.3.2 Reproducibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados sencillos e independientes, obtenidos en diferentes laboratorios, realizados por distintos analistas, usando equipo diferente, no debe ser mayor a los límites de reproducibilidad,  $R$ , (por ejemplo, reproducibilidad al 95% de nivel de confianza).

## 7 INFORME DE LA PRUEBA

El reporte debe especificar, al menos, la siguiente información:

- a) Información requerida para la completa identificación de la muestra;
- b) El método utilizado con referencia a esta norma mexicana;
- c) El resultado obtenido;
- d) Si la repetibilidad fue evaluada, el resultado final obtenido;
- e) Otros detalles no especificados en esta norma mexicana o declarados como opcionales, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado.

## 8 VIGENCIA

La presente norma mexicana entrará en vigor 60 días naturales después de la publicación de su Declaratoria de Vigencia en el Diario Oficial de la Federación.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- 9.1 NOM-008-SCFI-2002 Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de noviembre de 2002.
- 9.2 ISO 20481:2008 Coffee and coffee products - Determination of the caffeine content using high-performance liquid chromatography (HPLC) - Reference method. Primera edición. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 2008.



- 9.3** ISO Guide 30:1992 Terms and definition used in connection with reference materials. Segunda Edición. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 1992.
- 9.4** ISO 565:1990 Test sieves – Metal wire cloth, perforated metal plate and electroformed sheet – Nominal size of openings. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 1990.
- 9.5** ISO 648:2008 Laboratory glassware – Single volume pipettes. Segunda Edición. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 2008.
- 9.6** ISO 1042:1998 Laboratory glassware – One-mark volumetric flasks. Cuarta Edición. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 2008.
- 9.7** ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions. Primera Edición. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 1994.
- 9.8** ISO 5725-2:1994/Cor. 1:2002 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Primera Edición. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 2002.
- 9.9** ISO 5725-6:1994/Cor.1:2001 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values. Primera Edición. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 2001.
- 9.10** ISO 20938:2008 Instant coffee - Determination of moisture content – Karl Fischer method (Reference method). Primera Edición. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 2008.
- 9.11** Thompson, M., Ellison, S.L.R, Wood, R., For the interdivisional working party for harmonization of quality assurance schemes. The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of





analytical chemistry laboratories: IUPAC Technical Report. *Pure Appl. Chem.* 2006, 78, pp. 145-196.

- 9.12 Horwitz, W., Albert, R., The Horwitz ration (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision, *J AOAC Int.* 2006, 89, pp. 1095-1109.

## 10 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

La presente norma mexicana equivale parcialmente a la norma ISO 20481:2008, Coffee and coffee products - Determination of the caffeine content using high-performance liquid chromatography (HPLC) - Reference method. Primera edición. Organización Internacional de Normalización (ISO), Ginebra, Suiza. 2008.

México, D.F., a  
El Director General, **CHRISTIAN TURÉGANO ROLDÁN**.- Rúbrica.