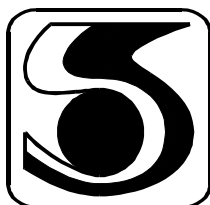


*Научно-технологическая
компания*

СИНТЕКО



**МЕТОДИКА
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КОФЕ И ЧАЯ
НА СОДЕРЖАНИЕ КОФЕИНА МЕТОДОМ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.**

ДЗЕРЖИНСК 1997г.

Настоящий документ распространяется на методику количественного химического анализа кофе и чая на содержание кофеина методом жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием.

1. Нормы точности измерений.

Минимально определяемое количество кофеина 0.1% при навеске 1г. Относительная погрешность определения кофеина в диапазоне 0.1-10% составляет $\pm 10\%$.

2. Сущность метода.

Пробы экстрагируют водой, фильтруют. Разделение компонентов пробы проводят на хроматографической колонке с фазой С-18, с последующим определением на спектрофотометрическом детекторе на длине волны 274 нм.

3. Аппаратура, материалы и реактивы.

3.1. Средства измерений»

3.1.1. Хроматограф жидкостный ионный "Цвет-3006М" ТУ 5Е1.550.186 со спектрофотометрическим детектором "СПФ-1" ТУ 5Е2.850.002.

3.1.2. Весы аналитические ВЛА-200г-М, ГОСТ 24104-89.

3.1.3. Колбы мерные на 25, 100 см³, ГОСТ 1770-74.

3.1.4. Пипетки мерные вместимостью 1,2, 5, 10 см³, ГОСТ 20292-74.

3.1.5. Колбы конические вместимостью 100 см³, ГОСТ 10394-72.

3.1.6. Стаканы вместимостью 150 см³, ГОСТ 25336.

3.1.7. Цилиндры мерные вместимостью 50, 250 см³, ГОСТ 170.

3.2. Вспомогательные устройства.

3.2.1. Электрокофемолка.

3.2.2. Насос вакуумный типа ВМ-461 М.

3.2.3. Баня водяная лабораторная.

3.2.4. Электроплитка бытовая.

3.2.5. Воронки стеклянные, ГОСТ 8613-75.

3.2.6. Фильтры беззолные бумажные "белая" или "красная" лента, диаметром 90-125мм.

3.3. Реактивы и материалы.

3.3.1. Ацетонитрил, хч.

3.3.2. Вода дистиллированная ГОСТ 6709-72.

3.3.3. Спирт этиловый, хч.

3.3.4. Кофеин, хч.

3.3.5. Колонка хроматографическая 100*6мм заполненная сорбентом Силасорб С-18, 5мкм.

Примечание! Допускается применять средства измерений и вспомогательные устройства, отличающиеся от указанных в перечне, но не уступающих им по метрологическим характеристикам, влияющим на результаты и погрешность измерений.

4. Требования безопасности.

При выполнении методики необходимо соблюдать правила техники безопасности, изложенные в инструкции по эксплуатации на хроматограф "Цвет-3006М" 5Е1.550.186. ТО, а также правила безопасной работы с вакуум-насосами и "Основные правила работы в химических лабораториях".

5. Требования к квалификации оператора.

К выполнению МКХА могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднетехническое образование и опыт работы в химической лаборатории с жидкостными хроматографами. Оператор должен быть знаком с устройством хроматографа, операциями проводимыми при выполнении измерений и обработке результатов.

6. Условия измерений.

6.1. При выполнении анализа проб должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха	20±5°C
относительная влажность воздуха	30 - 80%
атмосферное давление	84.0-106.7 кПа
напряжение переменного тока	220±22В
частота переменного тока	50±1 Гц

содержание агрессивных веществ в воздухе помещения не должно превышать санитарных норм. Механические воздействия, внешние электрические и магнитные поля, влияющие на работоспособность, должны быть исключены.

6.2. Условия хроматографического анализа.

Хроматографическое разделение компонентов пробы проводится на аналитической колонке из нержавеющей стали, длиной 100 мм и внутренним диаметром 6 мм, заполненной сорбентом С-18 фракции 5 мкм.

Эффективность колонки по пику кофеина не менее 1000 теоретических тарелок на метр.

Элюент - 10-20 % (v/v) ацетонитрила в воде.

Температура колонки - комнатная. Время выполнения анализа 12 мин. ; - Ориентировочное время удерживания кофеина - 8 мин. Объем дозируемой пробы - 20 мкл.

Расход элюента- 3.0см³/мин.

Длина волны спектрофотометра- 274 нм.;

Шкала чувствительности спектрофотометра -"16".

7. Подготовка к выполнению анализа.

7.1. Приготовление растворов.

7.1.1. Приготовление элюента.

Элюент готовят объемным способом. В колбу на 200 мл помещают 20 мл ацетонитрила и доводят до метки бидистиллированной водой. Элюент фильтруют через 0.45 мкм фильтр и, затем дегазируют с помощью вакуум насоса.

7.1.2. Приготовление исходного раствора кофеина.

Навеску 100.0 мг кофеина помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в этиловом спирте и доводят до метки. Полученный раствор хранят в темном месте при комнатной температуре.

7.1.3. Приготовление градуировочных растворов.

Указанные в таблице количества исходного раствора кофеина помещают в мерные колбы на 50 мл и доводят до метки элюентом. Приготовленные растворы хранят в темном месте. Растворы устойчивы в течение 1 месяца.

Таблица

№ градуировочного раствора	Количество исходного раствора, мл	Содержание кофеина в градуировочном растворе, мг/л
1	2,5	5,0
2	5,0	10,0
3	7,5	15,0

7.2. Подготовка пробы к анализу.

Из измельченного среднего образца отбирают навеску массой 1.0 г, помещают в стакан, заливают 100 см³ кипящей дистиллированной водой и кипятят 5 мин. Полученную суспензию охлаждают до 50-60° С, фильтруют, твердый осадок отбрасывают, а фильтрат помещают в колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. 2.5 см³ фильтрата помещают в колбу на 25 см³ и доводят до метки элюентом. Полученный раствор используют для ввода в хроматограф.

7.3. Подготовка измерительной аппаратуры.

Установку и включение хроматографа со спектрофотометрическим детектором осуществляют в соответствии с инструкциями по эксплуатации хроматографа "Цвет-3006М" и спектрофотометра "СПФ-1". Режим работы хроматографа устанавливается согласно п.б.2. Регистрация выходного сигнала осуществляется с помощью самописца, САА-05-03 или программно-аппаратных комплексов совместимых с IBM PC.

8. Выполнение измерений.

8.1. Определение градуировочных коэффициентов.

В хроматограф последовательно вводят градуировочные растворы №1,2,3. Используя полученные значения высот или площадей пиков строят калибровочный график. Методом наименьших квадратов определяют градуировочные коэффициенты А и В из уравнения:

$$У_{град} = А * С_{град} + В,$$

где У_{град} -выходной сигнал хроматографа высота или площади,

С_{град} -концентрация кофеина в градуировочном растворе.

8.2. Проведение анализа.

Вводят в хроматограф пробу. После окончания анализа значение выходного сигнала используют для определения концентрации по формуле:

$$С_{пробы} (\%) = \frac{У_{пробы} - В}{10 * А}$$

8.3. Протокол анализа.

В протоколе анализа указывают использованный метод и полученные результаты, все действия, не предусмотренные данной методикой, или рассматриваемые как дополнительные, а также любые обстоятельства, которые могли бы повлиять на результат.

В протокол должны быть включены все сведения, необходимые для полной идентификации пробы.

9. Контроль погрешности методики.

Настоящая МКХА предусматривает проведение периодического контроля случайной погрешности анализов, стабильности колонки, контроля правильности градуировки.

9.1. Периодический контроль случайной погрешности.

Для периодического контроля случайной погрешности анализов ежедневно обрабатывают результаты двух параллельных анализов градуировочного раствора №2. Относительное максимальное расхождение двух найденных значений пиков

У2 – У1
Усредн

не должно превышать 0.1. Результаты записываются в журнал. Если полученное относительное расхождение значений больше 0.1, следует проверить правильность заданных параметров эксперимента и исправность хроматографа.

9.2. Контроль правильности.

Периодичность контроля - не реже одного раза в неделю. Контроль правильности проводят методом "введено-найденно" путем сравнения результатов измерений введенных известных концентраций с расчетными значениями. Для этого выполняют анализ пробы градуировочной смеси №3 и используя градуировочный коэффициент, определяют найденное значение концентрации $S_{\text{найд}}$. При отсутствии систематической погрешности найденные значения должны быть равны введенным, т.е. выполняться равенство:

$$\frac{S_{\text{найд}} - S_{\text{введ}}}{S_{\text{введ}}} < 0.19 .$$

9.3. Контроль стабильности колонки проводится 1 раз в 2 недели. Контроль разделительной колонки проводят по расчету эффективности колонки при анализе градуировочного раствора №2 по формуле:

$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t}{w}\right)^2 \cdot L$$

где t - время удерживания пика кофеина, сек;

w - ширина пика кофеина на половине высоты пика, сек;

L - длина колонки

Найденное значение эффективности колонки по пику кофеина не должно быть меньше 1000 теоретических тарелок на метр.