«СОГЛАСОВАНО»
Заместитель директора
ГП «Центр эталонов,
стандартизации и метрологии
В.Н. ЛОБКО
«----------»----------1998г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный Государственный
Санитарный врач
Республики Беларусь
В.П. ФИЛОНОВ
«----------»----------1998г.

№ 7 - 9702

МЕТОДИКА

ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ КОФЕИНА В КОФЕ РАСТВОРИМОМ, МОЛОТОМ, ЗЕРНАХ И ЧАЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

МВИ. МН 1037-99

МИНСК
1996

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1. Область применения	3
2. Нормы погрешности измерений	3
3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы	4
3.1.Средства измерений	4
3.2. Вспомогательные устройства	5
3.3. Материалы и реактивы	5
4. Метод измерения	6
5. Требования безопасности	6
6. Требования к квалификации оператора	6
7. Условия выполнения измерений	6
8. Подготовка к выполнению измерений	6
8.1. Подготовка измерительной аппаратуры	6
8.2. Приготовление подвижной фазы	7
8.3 Приготовление градуировочных растворов	7
8.4. Установление градуировочной характеристики	8
8.5. Построение градуировочного графика	9
8.5.1. Контроль градуировочного графика	9
8.5.2. Оперативный контроль градуировочного графика	10
8.6. Подготовка анализируемых образцов	10
8.6.1. Кофе растворимый	10
8.6.2. Кофе молотый, в зернах	10
8.6.3. Чай	11
9. Выполнение измерений	11
10. Обработка результатов измерений	11
11. Оформление результатов испытаний	13
12. Контроль погрешности методики выполнения измерений	13
12.1.Средства контроля погрешности методики выполнения измерений	14
12.2. Порядок проведения контроля сходимости	14
12.3. Порядок проведения контроля воспроизводимости	15
12.4. Порядок проведения контроля точности	16
Приложение 1	20
Приложение 2	23
Приложение 3	24

1. Область применения

Методика предназначена для определения концентраций кофеина в кофе растворимом, молотом, в зернах и чае.

Кофеин относится к классу пуриновых алкалоидов, содержится в кофе и чае в количестве до 5%. По внешнему виду представляет собой белые шелковистые кристаллы или белый кристаллический порошок, без запаха, горького вкуса. Химическое название 1,3,7-метилксантин. Брутто формула $C_8H_{10}N_4O_2$. Молекулярная масса 194,19 г/моль. Температура плавления 234-237°С. Хорошо растворим в горячей воде, хлороформе. Трудно растворим в спирте. При нагревании возгоняется. Образует двойные соли с органическими кислотами.

Метод определения кофеина в кофе и чае основан на извлечении препарата водой с последующим анализом аликвотной части водного раствора методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в режиме изократического разделения на колонке с обращенной фазой (C_{18}) с использованием спектрофотометрического или диодно-матричного детектора.

Нижний предел измерения составляет 0,004 мкг кофеина в анализируемом объеме пробы (0,02см^3). Интервал определяемых концентраций составляет 0,1-10%. Присутствующие в экстракте коэкстрактивные вещества определению не мешают.

Время одного определения не превышает 40 мин, включая подготовку образца.

2. Нормы погрешности измерений

При доверительной вероятности p=0,95 относительная суммарная погрешность измерения, границы неисключенных систематических погрешностей, доверительные границы случайной погрешности МВИ в диапазоне определяемых концентраций 0,1-10% приведены в табл.1.

Таблица 1.

Кофеинсодержащий продукт	Доверительные границы случайной погрешности МВИ, %	Неисключенная систематическая составляющая погрешности МВИ, %	Относительная суммарная погрешность МВИ, %
Кофе растворимый	8,8	14,0	17
Кофе молотый, в зернах	10,7	14,6	19
Чай	11,5	15,3	20

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1.Средства измерений

Жидкостной хроматограф для высокоэффективной жидкостной хроматографии фирмы «Beckman» со спектрофотометрическим или диодно-матричным детектором		
Весы аналитические ВЛР-200		ГОСТ 24104-88Е
Микрошприцы для жидкостной хроматографии на 0,05см^3 фирмы Hamilton		
Кран дозатор с петлей на 0,02см^3		Reodyne (погрешность 1,0% согласно руководству по эксплуатации жидкостного хроматографа «Beckman»)
Колбы мерные		ГОСТ 1770-74Е
	2-50-2	
	2-100-2	
	2-200-2	
	2-1000-2	
Стакан химический	Н-1-250	ГОСТ 1770-74
Пипетки градуированные		ГОСТ 29227-91

1-1-1
1-1-2
1-1-5
1-1-10

Цилиндры мерные на 100см^3 ГОСТ 1770-74Е

3.2. Вспомогательные устройства

Колонка хроматографическая размером 4,6х150мм, зернение частиц 5 мкм Hypersil ODS (C_{18})

Фильтр «синяя лента» ГОСТ 12026-76

Иономер И-135 ТУ 25-0511. 044-84

Электрод стеклянный ТУ 25.05. 2234-77

Плитка электрическая ГОСТ 14919-83Е

Фильтр стеклянный пористый Пор16 ГОСТ 23932-90

Сито №5 металлическое ТУ 2-043-518-82

Могут быть использованы другие средства измерений и вспомогательные устройства, по точности и характеристикам не уступающие рекомендуемым в методике.

3.3. Материалы и реактивы

Кофеин Фирма Merck, 99,5% чистоты

Ацетат натрия $CH_3COONa \cdot 2H_2O$ о.с.ч. ГОСТ 199-78

Уксусная кислота, х.ч. ГОСТ 61-75

Вода бидистилированная

Ацетонитрил, ч. ТУ 6-09-3534-87

или для HPLC

Калий марганцевокислый, ч. ГОСТ 2049-75

4. Метод измерения

Для определения массовой доли кофеина в кофе используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, основанный на измерении оптической плотности водного экстракта кофе с использованием спектрофотометрического или диодно-матричного детектора при длине волны 274 нм и ширине оптической полосы 12 нм после изократического элюирования экстракта на хроматографической колонке ODS (C_{18}).

5. Требования безопасности

Анализ по данной методике должен выполняться согласно инструкции "Основные правила безопасности работы в химических лабораториях" - М.: Химия, 1979 г и инструкции по эксплуатации жидкостного хроматографа.

6. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, изучившие требования безопасности и настоящую методику , прошедшие подготовку для работы в качестве оператора жидкостного хроматографа.

7. Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150-69 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха - 20±5°С;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт.ст.);
- влажность воздуха не более 80% при температуре 25°С;
- напряжение питающей сети - 220±22 В;
- частота переменного тока - 50±1 Гц.

8. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, построение градуировочного графика, отбор и подготовка проб к анализу.

8.1. Подготовка измерительной аппаратуры

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для блока насосов и детектора (см. п.8.4

МВИ). Проводят стабилизацию работы хроматографа на рабочих режимах в течение 30-40 мин. Условием стабильности является дрейф нулевого сигнала (не превышающий 1-2% от шкалы регистрации сигнала 0,1-0,05 единиц оптической плотности).

8.2. Приготовление подвижной фазы

Приготовление буферного раствора: взвешивают 2,36г±0,0001г уксуснокислого натрия, растворяют в 800см^3±50см^3 воды, используя стакан химический объемом 1000см^3. Измеряют pH раствора с использованием иономера. Устанавливают pH 4,3-4,4 используя раствор уксусной кислоты 1:10. Электроды иономера обмывают небольшим количеством воды. Полученный раствор количественно, обмывая стенки стакана, переносят в мерную колбу объемом 1000см^3 и доводят до метки водой. Полученный раствор имеет концентрацию 0,02М.

Буферный раствор используют для приготовления подвижной фазы (системы элюентов), состоящей из 0,02 М раствора ацетата натрия (pH 4,3-4,4) и ацетонитрила в соотношении 85:15 по объему.

Ацетонитрил, пригодный для использования в качестве элюента для жидкостной хроматографии, получают из ацетонитрила марки «ч». Для этого в перегонную колбу вместимостью 2 дм^3 помещают 1,5 дм^3 ацетонитрила марки «ч» и 30 г $KMn0_4$, кипятят с обратным холодильником 1 час и перегоняют с дефлегматором, отбирая фракции по 200 см^3. Первую фракцию отбрасывают, остальные фракции собирают. Перегонку прекращают когда в колбе останется 200 –150 см^3 раствора. Ацетонитрил для HPLC используют без предварительной подготовки.

8.3 Приготовление градуировочных растворов

Приготовление основного стандартного раствора кофеина. Готовят основной стандартный раствор кофеина концентрацией 2000 мкг/см^3, взвешивая 200 мг кофеина с точностью ±0,15мг и растворяют в мерной колбе на 100 см^3 водой.

Приготовление рабочего стандартного раствора кофеина. Из основного стандартного раствора кофеина готовят рабочий стандартный раствор кофеина концентрацией 200 мкг/см^3. Для этого отбирают 10 см^3 основного стандартного раствора, переносят в мерную колбу на100 см^3 и доводят водой до метки.

Приготовление градуировочных растворов кофеина. Градуировочные растворы кофеина готовят по схеме, представленной в табл.1.

Таблица 1.

№ градуировочного раствора	Концентрация кофеина в градуировочном растворе, мкг/см^3	Аликвотная часть рабочего стандартного раствора кофеина, мкг/см^3
1	0,2	0,1
2	0,5	0,25
3	1,0	0,5
4	2,0	1,0
5	4,0	2,0
6	6,0	3,0
7	8,0	4,0
8	10,0	5,0

Аликвотные части рабочего стандартного раствора кофеина переносят в мерные колбы объемом 100см^3 и доводят водой до метки. Каждый градуировочный раствор готовится и хроматографируется не менее трех раз с интервалом в 1 день.

8.4. Установление градуировочной характеристики

Каждый градуировочный раствор хроматографируют по два раза, начиная с самой низкой концентрации, принимая за результат измерения среднее арифметическое двух параллельных измерений. Условия хроматографирования при анализе кофеина:

Объем вводимой пробы	0,02см^3
Скорость потока элюента	0,8-1,0мл/мин
Колонка хроматографическая Hypersil ODS (C_{18}), размером4,0х125мм; зернение частиц 5 мкм	
Длина волны поглощения	274 нм
Ширина полосы поглощения	4-28 нм
Время удерживания кофеина	4-5 мин

8.5. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика измеряют площади пиков, соответствующие концентрации кофеина в градуировочных растворах. Полученные данные заносят в таблицу и рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой $Y = a + bX$ методом наименьших квадратов (приложение 1).

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения $Y = a + bX$, где

Y- площадь пика кофеина;

X- концентрация кофеина в градуировочном растворе;

a и b- коэффициенты регрессии.

Погрешность градуировочного графика не должна превышать 13%.

8.5.1. Контроль градуировочного графика

Контроль градуировочного графика осуществляется по градуировочным растворам кофеина. Для контроля должны применяться растворы с концентрацией кофеина, входящей в диапазон измерений, но не повторяющие по значениям концентрации, по которым рассчитывались параметры градуировочной прямой. Допустимые расхождения между заданными и установленными по графику значениями концентраций используемых для контроля градуировочных растворов не должны превышать 13%. В противном случае график подлежит повторной перепроверке и, при необходимости, новому расчету параметров градуировочной прямой. График подлежит обязательной проверке при замене партии реактивов и посуды, после ремонта оборудования, но не реже одного раза в месяц.

8.5.2. Оперативный контроль градуировочного графика

Для оперативного контроля градуировочного графика перед началом измерений используется 1-2 градуировочных раствора из диапазона измерений кофеина. Полученные при хроматографировании значения Y не должны отклоняться от градуировочной прямой более чем на величину доверительной границы случайной составляющей погрешности градуировочного графика E=8,3%.

В противном случае график подлежит повторной перепроверке по п.8.5.1.

8.6. Подготовка анализируемых образцов

8.6.1. Кофе растворимый. Навеску средней пробы 2 г помещают в мерную колбу вместимостью 200 $см^3$, растворяют в 170-180 $см^3$ дистиллированной воды и доводят раствор до метки. Затем раствор тщательно перемешивают в течение 1 мин., отбирают 2 $см^3$ полученного раствора, переносят в мерную колбу на 100 $см^3$ и доводят до метки водой. Раствор перемешивают и отбирают микрошприцем 0,025-0,03$см^3$ раствора и вводят в хроматограф, используя кран-дозатор с петлей на 0,02 $см^3$.

8.6.2. Кофе молотый, в зернах. Среднюю навеску кофе 2г, отобранную из предварительно измельченного на кофемолке и просеянного через сито №5 образца, помещают в стеклянный стакан или коническую колбу из термоустойчивого стекла, добавляют 170-180 см горячей дистиллированной воды и кипятят на плитке в течение 5 мин с момента закипания, периодически перемешивая раствор. Сосуд для кипячения прикрывают предметным стеклом. Раствор охлаждают до комнатной температуры, смывают конденсат с предметного стекла, присоединяя его к раствору, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 $см^3$ и доводят до метки водой. Раствор тщательно перемешивают в течение 1 мин и фильтруют через плотный бумажный фильтр (синяя лента). Отбирают 2 $см^3$ фильтрата переносят в мерную колбу на 100 $см^3$ и доводят до метки водой. Раствор перемешивают и отбирают микрошприцем 0,025-0,03$см^3$ раствора и

вводят в хроматограф, используя кран-дозатор с петлей на 0,02 $см^3$.

8.6.3. Чай. Из средней пробы чая измельченного на кофемолке и просеянного через сито №5, отбирают навеску 1г, помещают в стеклянный стакан или коническую колбу из термоустойчивого стекла, добавляют 170-180 $см^3$ горячей дистиллированной воды и кипятят на плитке в течение 5 мин с момента закипания, периодически перемешивая раствор. Сосуд для кипячения прикрывают предметным стеклом. Раствор охлаждают до комнатной температуры, смывают конденсат с предметного стекла, присоединяя его к раствору, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 $см^3$ и доводят до метки водой. Раствор тщательно перемешивают в течение 1 мин и фильтруют через плотный бумажный фильтр (синяя лента). Отбирают 2 $см^3$ фильтрата , переносят в мерную колбу на 100 $см^3$ и доводят до метки водой. Раствор перемешивают и отбирают микрошприцем 0,025-0,03$см^3$ раствора и вводят в хроматограф, используя кран-дозатор с петлей на 0,02 $см^3$.

9. Выполнение измерений

Анализ полученных экстрактов кофе проводится на жидкостном хроматографе. Условия хроматографирования:

Объем вводимой пробы	0,02$см^3$
Скорость потока элюента	0,8-1,0мл/мин
Колонка хроматографическая Hypersil ODS (C_{18}), размером4,0х125мм; зернение частиц 5 мкм	
Длина волны поглощения	274 нм
Ширина полосы поглощения	4-28 нм
Время удерживания кофеина	4-5 мин

Определяют площади пиков, используя компьютерную систему обработки сигналов. Проводят анализ двух параллельных проб. Каждую пробу хроматографируют не менее двух раз.

10. Обработка результатов измерений

Массовую долю кофеина (X) в чае, кофе молотом, растворимом и

зернах рассчитывают в процентах в пересчете на сухое вещество по формуле :

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{V_a \cdot M} \cdot \frac{100}{100 - W}$$

C - концентрация кофеина, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3

V_1 - объем исходного экстракта, см^3 (200см^3);

V_2 - объем конечного экстракта, см^3 (100см^3);

100 - коэффициент для пересчета процентного содержания кофеина в образце;

V_a - объем аликвоты исходного раствора, см^3 (2см^3);

M - масса навески, мкг;

W - массовая доля влаги в анализируемом образце, %.

За результат анализа принимают среднее арифметическое значение концентраций кофеина двух параллельных проб. Вычисления проводят до второго десятичного знака с последующим округлением до первого десятичного знака.

Гарантированный результат анализа представляют в следующем виде:

$$C = \overline{C} \pm \Delta МВИ, \text{ где}$$

$$\overline{C} = \frac{C_1 + C_2}{2}$$

C_1 – концентрация кофеина в первой пробе;

C_2 – концентрация кофеина во второй пробе;

$\overline{C}$ - средняя концентрация кофеина, найденная по результатам анализов двух параллельных проб.

Допустимые расхождения между результатами параллельных определений не должны превышать:

-для кофе растворимого – 14,4%

-для кофе молотого, в зернах – 17,7%

-для чая – 15,3%

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений при установленных методикой измерений влияющих

факторов составляет:

-для кофе растворимого – 14,0%

-для кофе молотого, в зернах – 14,6%

-для чая – 15,3%

Допустимые расхождения между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях при доверительной вероятности p=0,95 не должны превышать следующих величин по отношению к среднему арифметическому значению:

-для кофе растворимого – 34%

-для кофе молотого, в зернах – 38%

-для чая – 40%

11. Оформление результатов испытаний

Результаты измерений оформляются по форме, установленной действующей в лаборатории системой регистрации данных.

Результаты должны включать следующую информацию:

-наименование (шифр) пробы;

-дату проведения измерений;

-результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;

-данные о построении или контроле градуировочного графика;

-результаты параллельных определений;

-окончательный результат измерений;

-значение приписанной или расчитанной погрешности измерения или ее составляющих;

-фамилию оператора.

12. Контроль погрешности методики выполнения измерений

Контроль погрешности МВИ осуществляется с целью оперативной информации о качестве измерений рабочих проб и для принятия оперативных мер, предупреждающих ухудшение точности результатов.

В процессе внутреннего оперативного контроля определяются

показатели сходимости, воспроизводимости и точности.

12.1. Средства контроля погрешности методики выполнения измерений

В качестве средств контроля в процессе определения показателей качества результатов анализа применяются:

-рабочие пробы – для определения показателей сходимости и воспроизводимости;

-рабочие пробы с добавкой – при определении показателей точности.

Результаты контроля воспроизводимости и точности фиксируются в соответствии с установленной системой регистрации контроля правильности выполнения измерений, результаты контроля сходимости выполняются для каждого анализа и фиксируются в рабочих журналах исполнителей.

12.2. Порядок проведения контроля сходимости

Контроль сходимости результатов измерений проводится при получении каждого результата измерения, предусматривающего проведение параллельных определений.

Контроль сходимости заключается в сравнении расхождений результатов параллельных определений, полученных при анализе рабочей пробы, с нормативом сходимости – d.

Норматив сходимости d рассчитывается по формуле:

$$d = Q(p,n)S_{xi},$$

где

d – норматив сходимости;

$Q(p,n)$ – коэффициент, определяемый по статистическим таблицам, исходя из заданной доверительной вероятности P и числа параллельных определений при анализе рабочей пробы в соответствии с методикой. Для $n=2$ и $P=0,95$ - $Q(p,n)=2,77$;

S_{xi} – СКО результата единичного определения.

Сходимость результатов параллельных определений рассчитывается по формуле:

$$d_k = X_{i\max} - X_{i\min},$$

где

d_k –фактическая сходимость параллельных определений;

$X_{i\,max}$ –максимальный результат из «n» параллельных измерений;

$X_{i\,min}$ -минимальный результат из «n» параллельных измерений;

Если $d_k \le d$, то сходимость результатов параллельных определений признается удовлетворительной, и по ним может быть рассчитан результат измерений при рабочих измерениях или контрольном измерении.

Если $d_k > d$, то рабочая или контрольная проба подлежит повторному измерению. При повторном превышении указанного норматива необходимо выяснить причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устранить их.

12.3. Порядок проведения контроля воспроизводимости

Контроль воспроизводимости результатов измерений проводится не реже 2-3 раз в месяц с использованием рабочих проб. Контроль воспроизводимости обязателен при смене партии реактивов, посуды, после ремонта оборудования, существенных изменений условий выполнения измерений.

Контроль воспроизводимости проводится путем сравнения результата контрольной процедуры D_k, равного расхождению двух результатов измерений – первичного и повторного – содержания кофеина в одной и той же рабочей пробе с нормативом воспроизводимости D.

Первичный и повторный результат измерений должен быть получен в разных условиях, например, двумя операторами в один день или одним оператором в два последующих дня и т.д.

D_k рассчитывается по формуле:

$$D_k = \overline{X}_1 - \overline{X}_2,$$

где

$\overline{X}_1$ - первичный результат измерения рабочей пробы;

$\overline{X}_2$ - повторный результат измерения рабочей пробы.

Величины $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ должны быть получены с соблюдением условий сходимости.

Норматив воспроизводимости D рассчитывается по формуле:

$$D = Q(p,m)S_{\overline{X}},$$

где

D –норматив воспроизводимости;

$Q(p,m)$ – коэффициент, определяемый по статистическим таблицам, исходя из заданной доверительной вероятности P и числа повторных измерений рабочей пробы m. Для $m=2$ и $P=0,95$ - $Q(p,m)=2,77$;

$S_{\overline{X}}$ – СКО результата измерений при двух параллельных определениях.

Если $D_k \le D$, то воспроизводимость контрольных измерений признается удовлетворительной. В этом случае воспроизводимость результатов измерений рабочих проб, полученных в условиях, соответствующих требованиям МВИ, признается удовлетворительной.

В случае превышения норматива воспроизводимости, когда $D_k > D$, контроль повторяют. При повторном превышении указанного норматива должны быть выяснены и устранены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля воспроизводимости.

12.4. Порядок проведения контроля точности

Контроль точности результатов измерений осуществляется с использованием метода добавок. Образцами для контроля точности являются рабочие пробы и эти же пробы с добавкой кофеина.

К пробе с добавкой предъявляются следующие требования:

-добавка должна вводиться в пробу на самой ранней стадии измерений в целях проведения пробы с добавкой через все последующие стадии пробоподготовки и анализа;

Примечание: в целях уменьшения погрешности за счет неоднородности распределения вводимой добавки целесообразно рассчитанное количество добавки вносить непосредственно в подготовленную навеску пробы;

-количество вводимой добавки должно составлять 50-150% от установленного содержания кофеина в пробе;

-проба с введенной добавкой не должна выходить за верхнюю границу определяемых содержаний кофеина согласно МВИ.

В качестве добавки используются водные растворы кофеина необходимой концентрации. Расчет необходимой концентрации производится исходя из того, что в навеску должно вносится около 10 $см^3$ раствора для получения пробы с добавкой в диапазоне 50-150% ранее установленного содержания кофеина в пробе.

После внесения добавки проба выдерживается 5-10 мин., а затем анализируется в соответствии с МВИ.

Контроль точности проводится по результатам измерений пробы до введения добавки ($X_{пр.}$) и после введения добавки кофеина ($X_{пр.доб.}$) концентрацией $C_{доб.}$ в исходную пробу. Разница ($K_к$) между найденной ($X_{доб.}=X_{пр.доб.}-X_{пр.}$) и введенной $C_{доб.}$ концентрацией добавки не должна превышать по абсолютной величине значения норматива точности K.

Значения $K_к$ и K рассчитываются по формулам:

$K_к=|X_{пр.доб.}-X_{пр.}-C_{доб.}|$,

где

$K_к$ – рассчитанный параметр точности;

$X_{пр.доб.}$ –содержание кофеина в пробе с добавкой;

$X_{пр.}$ –содержание кофеина в исходной пробе;

$C_{доб.}$ –концентрация введенной добавки.

$K=1,41\Delta$ – для доверительной вероятности $P=0,95$;

$K=1,19\Delta$ –для доверительной вероятности $P=0,90$,

где

Δ – погрешность МВИ.

В том случае, когда погрешности определения кофеина в исходной пробе и пробе с добавкой различаются более чем на 30%, для расчета норматива точности используется следующая формула:

$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta X_{пр.})^2 + (\Delta X_{пр.доб.})^2}$ - для доверительной вероятности P=0,90;

$K = \sqrt{(\Delta X_{пр.})^2 + (\Delta X_{пр.доб.})^2}$ - для доверительной вероятности P=0,95,

где

K –норматив точности;

$\Delta X_{пр.}$ –погрешность определения содержания кофеина в исходной пробе;

$\Delta X_{пр.доб.}$ –погрешность определения содержания кофеина в пробе с добавкой.

Если для расчета используются относительные значения погрешностей $\Delta_{отн.}$, $\Delta X_{пр.отн.}$, $\Delta X_{пр.доб.отн.}$, то относительное значение $K_{к\ отн.}$ рассчитывается по формуле:

$$K_{\underset{отн.}{к}} = \frac{K_к}{C_{доб}},$$

где

$K_к$ –абсолютное значение $K_к$;

$C_{доб.}$ –значение добавки введенной в исходную пробу.

Точность контрольных измерений, а также точность результатов измерений рабочих проб, выполненных в условиях соблюдения требований МВИ, признается удовлетворительной, если $|K_к| \le K$.

Если $|K_к| > K$, то точность контрольных измерений признается неудовлетворительной и процедура контроля повторяется с использованием другой рабочей пробы. При повторном получении неудовлетворительных результатов контроля точности, выясняют и устраняют причины, приводящие к неудовлетворительному контролю.

Методика разработана в Республиканском научно-практическом центре по экспертной оценке качества и безопасности продуктов питания Министерства Здравоохранения РБ.

Разработчики:

Зав.лаб., к.х.н. — Шуляковская О.В.

Ст.н.с. — Зубкевич Л.В.

Н.с. — Белышева Л.Л.

техник — Скорбайте Е.А.

Приложение 1

(обязательное)

Порядок определения параметров градуировочной характеристики и построения градуировочного графика

Зависимость площади хроматографического пика от концентрации кофеина характерезуется прямой

$$Y = a + bX, \qquad (1)$$

где

Y – экспериментальные данные (площадь хроматографического пика);

X – концентрация кофеина в растворе;

a и b – коэффициенты регрессии.

Коэффициенты регрессии расчитываются по формулам:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i^2 \sum_{i=1}^{n} Y_i - \sum_{i=1}^{n} X_i \sum_{i=1}^{n} X_i Y_i}{n\sum_{i=1}^{n} X_i^2 - (\sum_{i=1}^{n} X_i)^2} \qquad (2)$$

$$b = \frac{n\sum_{i=1}^{n} X_i Y_i - \sum_{i=1}^{n} X_i \sum_{i=1}^{n} Y_i}{n\sum_{i=1}^{n} X_i^2 - (\sum_{i=1}^{n} X_i)^2}, \qquad (3)$$

где

n – число эталонов в серии;

X_i – концентрация кофеина в i-том эталоне;

Y_i – значение площади хроматографического пика для i-того эталона.

Значения Y_i и X_i заносятся в таблицу:

X_i	Y_i	X_i^2	X_iY_i	$Y_{выч}$	Y_i-$Y_{выч}$	$(Y_i-Y_{выч})^2$	$Y_{окi}$	Y_i-$Y_{ок}$	$(Y_i-Y_{ок})^2$

Вычисляются значения сумм:

$$\sum_{i=1}^{n} X_i ; \sum_{i=1}^{n} Y_i ; \sum_{i=1}^{n} X_i^2 ; \sum_{i=1}^{n} X_i Y_i ; \sum_{i=1}^{n} (Y_i - Y_{выч.i})^2 ; \sum_{i=1}^{n} (Y_i - Y_{ок.i});$$

Полученные значения подставляются в формулы (1) и (2), рассчитываются коэффициенты регрессии a и b.

Когда a мало отличается от нуля, то проверяют значимость этой величины и по таблице значения вероятностей $P(|t| \geq t_a)$ по распределению Стьюдента находят вероятность P неравенства $|t| \geq t_a$ при к=n-2. Если P>0,05, то метод не содержит систематической ошибки и величину a в уравнении $Y = a + bX$ можно приравнять к нулю и вновь рассчитать угловой ко эффициент прямой, проходящей через начало координат:

$$b_{исп} = \frac{\sum X_i Y_i}{\sum X_i^2} \qquad (4)$$

$$Y_{ок} = b_{исп} X \qquad (5)$$

Значение t_a вычисляют по формуле: $t_a = \frac{|a|}{S_a}$

$$t_a = \frac{|a|}{S_a}, \qquad (6)$$

где

S_a –стандартное отклонение параметра a

Расчет стандартного отклонения значения a производится по формуле:

$$S_a = S_y \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} X_i^2}{n\sum_{i=1}^{n} X_i^2 - (\sum_{i=1}^{n} X_i)^2}}, \qquad (7)$$

где

S_y - стандартное отклонение значения Y_i

X_i – концентрация кофеина в i-том эталоне;

n – число эталонов в серии.

Расчет стандартного отклонения значения Y_i производится по формуле

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(Y_i - Y_{выч.i})^2}{n-2}}, \qquad (8)$$

где

n – число эталонов в серии;

Y_i – значение площади хроматографического пика для i-того эталона;

$Y_{выч.i}$ – вычисленное значение площади хроматографического пика для i-того эталона.

Приложение 2

(информационное)

Перечень используемой документации

1. ГОСТ 24104-88Е «Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.»
2. ГОСТ 1550-69 «Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнение для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды.»
3. ГОСТ 1770-74Е «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия.»
4. ГОСТ 29227-91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Общие требования.»
5. ГОСТ 23932-90 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные.»
6. ГОСТ 14919-83Е «Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия.»
7. ГОСТ 20490-75 «Калий марганцевокислый. Технические условия.»
8. ГОСТ 61-75 «Кислота уксусная. Технические условия.»
9. ГОСТ 199-78 «Натрий уксуснокислый. Технические условия.»
10. ТУ 6-09-3534-87 «Ацетонитрил ч. Технические условия.»
11. ГОСТ 12026-76 «Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.»
12. ГОСТ 8.207-76 «Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения.»
13. ТУ 25-0511. 44-84 Иономер лабораторный типа И-130
14. ТУ 25.05.2234-77 Электроды стеклянные лабораторные ЭСЛ-43-07
15. ТУ 2-043-518-82 Сита лабораторные

Приложение 3

(информационное)

Значения точностных параметров методики

Параметры точности, %	Кофе растворимый	Кофе молотый, в зернах	Чай
Диапазон измерения	0,1-10	0,1-10	0,1-10
Число параллельных определений, n	2	2	2
Допустимые расхождения между результатами в разных лабораториях,	34	38	40
Случайная составляющая погрешности результата определений при P=0,95 $S_{\bar{X}i}$	5,2	6,4	6,8
Случайная составляющая погрешности результата измерения при n=2 P=0,95 $S_{\bar{X}}$	3,7	4,5	4,8
Доверительный интервал случайной составляющей погрешности измерений при n=2 P=0,95 E	8,8	10,7	11,5
Систематическая составляющая погрешности измерений Θ	14,0	14,6	15,3
Относительная погрешность МВИ Δ	17	19	20
Погрешность градуировочного графика $\Delta_{гр}$	13	13	13
Доверительные границы случайной составляющей погрешности градуировочного графика E_y	8,3	8,3	8,3
Норматив сходимости d	14,4	17,7	18,8
Норматив воспроизводимости D	10,3	12,5	13,3
Норматив точности K	23,9	26,4	27,8

ОКПО 02568454

ДЗЯРЖАЎНЫ КАМІТЭТ ПА
СТАНДАРТЫЗАЦЫІ, МЕТРАЛОГІІ І
СЕРТЫФІКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
(ДЗЯРЖСТАНДАРТ)

Дзяржаўнае прадпрыемства
**"ЦЭНТР ЭТАЛОНАЎ,
СТАНДАРТЫЗАЦЫІ І МЕТРАЛОГІІ"
- ДП "ЦЭСМ"**

220053 г. Мінск Старавіленскі тракт 93
Тэлефон (017) 237-55- 01 Факс (017) 213-09-38
Тэлетайп 252170 "SHKAL BY"
Эл. пошта : gost.e-ecolog.ru
Разліковы рахунак: 3012002840020
ГУАК БелПСБ г.Мінска МФО 334

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО
СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И
СЕРТИФИКАЦИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
(ГОССТАНДАРТ)

Государственное предприятие
**"ЦЕНТР ЭТАЛОНОВ,
СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ"
- ГП "ЦЭСМ"**

220053 г. Минск Старовиленский тракт 93
Телефон (017) 237-55- 01 Факс (017) 213-09-38
Телетайп 252170 "SHKAL BY"
Эл. почта : gost.e-ecolog.ru
Расчётный счет: 3012002840020
ГУАК БелПСБ г.Минска МФО 334

26.06.99 № _____

На № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 89/ 99

Методика определения концентраций кофеина в кофе растворимом, молотом, зернах и чае методом высокоэффективном жидкостной хроматографии

МВИ.МН 1037-99

Предназначена для определения концентраций кофеина в кофе растворимом, молотом, зернах и чае методом высокоэффективном жидкостной хроматографии.

При принятой доверительной вероятности p = 0,95 относительная суммарная погрешность, границы неисключенных систематических погрешностей, доверительные границы случайной погрешности в диапазоне определяемых концентраций 0,1-10% составляют:

продукты	доверит.границы случайной погрешн.	неискл.систематт. составл.погреш.	относительная суммарная погрешность
кофе раствор.	8,8%	14,0 %	17%
кофе молотый	10,7%	14,6%	19%
чай	11,5%	15,3%	20%

Заместитель директора В.П. Лобко

gost.e-ecolog.ru