

# ИНСТРУКЦИЯ

**по применению Аналитического комплекта**

***Кофе растворимый***

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении углеводов и кофеина в растворимом кофе и кофейных напитках. В Инструкции также изложены рекомендации по работе с анализируемыми пробами, соблюдение которых повышает степень извлечения определяемых компонентов.

Авторы предлагаемых в настоящей Инструкции методических подходов с радостью и огромным вниманием отнесутся к любым замечаниям и предложениям, относящимся к работе с Аналитическими комплектами.

## **1. Цель и назначение Аналитического комплекта *Кофе растворимый***

### ***1.1. Цель выпуска комплекта***

Целью выпуска Аналитического комплекта является обеспечение массового контроля образцов растворимого кофе в условиях сертификационных центров Госстандарта и ГСЭН РФ, а также аккредитованных испытательных лабораторий.

Диапазоны измеряемых массовых долей (в пересчете на сухое вещество) составляют:

- Кофеин - 0,15÷5%
- Общая глюкоза - 1,0÷10%
- Общая ксилоза - 0,3÷3%.

### ***1.2. Назначение комплекта***

Аналитический комплект *Кофе растворимый* предназначен для проведения подготовки проб и количественного определения методом ВЭЖХ кофеина, общих глюкозы и ксилозы, содержание которых нормируется в ГОСТ Р 51881-2002 “Кофе натуральный растворимый. Общие технические условия”.

### ***1.3. Особенности комплекта***

ГОСТ Р 51881-2002 предусматривает проведение ВЭЖХ-анализа указанных компонентов по двум отдельным методикам, приведенных в следующих стандартах:

- ИСО 10095-92 “Кофе. Определение содержания кофеина. Метод высоко-эффективной жидкостной хроматографии”.
- ГОСТ Р 51880-2002 (ИСО 11292-95) “Кофе растворимый. Определение массовых долей свободных и общих углеводов. Метод высокоэффективной анионообменной хроматографии”.

Наличие двух самостоятельных цепочек подготовки проб и применение уникального дорогостоящего хроматографического оборудования с избыточно высокими требованиями (ИСО 11292-95) делают проблематичным использование указанных методик для массовых испытаний образцов кофе и кофепродуктов.

В Аналитическом комплекте *Кофе растворимый* реализован способ сопряженного ВЭЖХ-анализа кофеина, глюкозы и ксилозы из общей пробы гидролизата растворимого кофе по ГОСТ Р 51880-2002. Это позволяет использовать простые и дешевые изократические конфигурации жидкостных хроматографов со спектрофотометрическим (кофеин) и рефрактометрическим (глюкоза, ксилоза) детекторами.

Метод ВЭЖХ-анализа растворимого кофе и кофейных напитков, реализованный в Аналитическом комплекте, обладает следующими характерными особенностями:

- ⇒ Предварительная подготовка (очистка) проб продуктов после полного кислотного гидролиза методом твердофазной экстракции на одноразовых патронах Диапак-АминМ;

- 
- ⇒ Выделение целевой фракции углеводов методом полупрепаративной ВЭЖХ на колонке RESEX RPM-Monosaccharide при 85°C с одновременным количественным анализом кофеина;
  - ⇒ ВЭЖХ-анализ целевой фракции углеводов в изократическом режиме на аналитической колонке Диасфер-110-Амин с использованием любого жидкостного хроматографа, снабжённого рефрактометрическим детектором;
  - ⇒ Детектирование кофеина в УФ-области спектра на длинах волн 254-300 нм (ISO 10095-1992. “Кофе. Определение содержания кофеина. Метод с применением высоко-эффективной жидкостной хроматографии”).

## II. Состав комплекта<sup>1</sup>

1. Концентрирующие патроны ДИАПАК-АминМ (ТУ 4215-002-05451931-94) для пробоподготовки методом твердофазной экстракции 100 единичных проб - 100 шт.
2. Аналитическая ВЭЖХ-колонка RESEX RPM-Monosaccharide, , 300×7,8 мм – 1 шт.
3. Предколонка универсальная “Security Guard”:  
– Держатель аналитических патронов– 1 шт.

---

<sup>1</sup> Примечание.

Общелабораторное оборудование и растворители в состав аналитического комплекта не входят.

### III. Порядок пробоподготовки

---

- Патроны для анализа углеводов, Carbo-Pb<sup>+2</sup> – 8шт./уп.
- 4. Аналитическая ВЭЖХ-колонка ДИАСФЕР-110-Амин (ТУ 4215-001-05451931-94), d<sub>p</sub>= 5-7 мкм, 250×4 мм - 1 шт.
- 5. Набор стандартных образцов с содержанием основного вещества не менее 99 % :
  - Кофеин – 2 г; Fluka Кат.№ 27600
  - Глюкоза – 5 г; Acros Кат.№ 17008
  - Ксилоза – 1 г; Acros Кат.№ 14100
- 6. Инструкция по применению комплекта *Кофе растворимый*.

## III. Порядок пробоподготовки

### III.1. Проведение полного кислотного гидролиза

Навеску (М) 0,50 г растворимого кофе или кофейного напитка поместить в мерную колбу объемом 50 мл, добавить 12,5 мл 1 н. раствора соляной кислоты и перемешать. Гидролиз проводить на кипящей водяной бане в течение 2,5 часов, встряхивая колбу каждые 30 мин. Уровень гидролизующего раствора должен быть ниже уровня воды в бане.

Содержимое колбы охладить под струей водопроводной воды до комнатной температуры и довести водой до метки (V<sub>гидр</sub>). Профильтровать гидролизат через складчатый бумажный фильтр.

### ***III.2. Проведение предварительной очистки***

1,5-2 мл фильтрата пропустить через концентрирующий патрон Диапак-АминМ при помощи шприца с наконечником типа “Луер” со скоростью не более 1-2 капель в секунду, отбрасывая первые 0,5 мл и собирая ровно 1 мл очищенного гидролизата продукта.

## **IV. Порядок проведения количественного анализа**

### ***IV.1. Препаративное выделение углеводной фракции. Количественный анализ кофеина***

#### **IV.1.1. Приготовление элюента для хроматографического анализа**

Бидистиллированную воду профильтровать через мембранный фильтр с размером пор не более 0,5 мкм и дегазировать любым способом (*элюент А*).

#### **IV.1.2. Подготовка хроматографической системы**

Собрать систему, включающую изократический хроматограф, снабженный ручным или автоматическим инжектором с петлей объемом 200 мкл, термостат для хроматографической колонки с верхним пределом температуры **не менее 85°C**, спектрофотометрический детектор (длины волн: **195-200 нм** – анализ углеводов, **254-300 нм** – анализ кофеина).

Установить в термостат колонку REZEX RPM-Monosaccharide и нагреть до  $85^{\circ}\text{C}$ . Затем включить насос и прокачивать элюент А со скоростью 0,9 мл/мин до стабилизации базовой линии детектора *на выбранной длине волны* (не менее 40-60 мин при стабильной температуре в термостате).

#### IV.1.3. Градуировка хроматографической системы

Градуировку подготовленной (п. IV.1.2) хроматографической системы осуществлять последовательным вводом рабочих растворов кофеина в элюенте А (диапазон концентраций 0,5-0,01 мг/мл), начиная с раствора наименьшей концентрации. Каждый раствор вводить в объеме 500 мкл не менее 2 раз. После записи градуировочных хроматограмм провести математическую обработку с фиксацией площадей и времен удерживания пиков (ориентировочное время удерживания кофеина 28 мин) и построить градуировочную зависимость.

#### IV.1.4. Определение интервала времени отбора углеводной фракции

Ввести в стабилизированную хроматографическую систему (длина волны 195-200 нм) 200 мкл стандартного образца (СО) смеси глюкозы и ксилозы в элюенте А с концентрациями 13,0 и 3,0 мг/мл, соответственно. Идентифицировать пики по времени удерживания и точно определить интервал времени между началом выхода пика глюкозы и окончанием выхода пика ксилозы (ориентировочно 7 мин 40 сек - 10 мин). ***От тщательности разметки пиков зависит полнота сбора целевой фракции углеводов и степень ее загрязненности посторонними компонентами!***

#### IV.1.5. Препаративное выделение углеводной фракции

Ввести в хроматографическую систему (длина волны 254-300 нм) 500 мкл очищенного (п. III.2) гидролизата пробы и в установленном интервале времени отобрать целевую фракцию из *выходного* капилляра детектора в отгонную сердцевидную колбу объемом не менее 25 мл.

Добавить в колбу 5-6 мл ацетонитрила и упарить элюат досуха при температуре 75-80°C и слабом вакууме, при необходимости добавляя порции ацетонитрила. Охладить колбу до комнатной температуры и тщательно растворить сухой остаток в 250 мкл *элюента Б* по п.IV.2.1.(*фракция углеводов*).

#### IV.1.6. Количественный анализ кофеина

После записи хроматограммы гидролизата пробы идентифицировать по времени удерживания и рассчитать площадь пика кофеина. С использованием градуировочной зависимости определить массовую концентрацию кофеина в гидролизате и по формуле (IV.1) рассчитать его содержание в исходном продукте.

$$W_{i\text{Caf}} = 10^3 \times C_i \times V_{\text{гидр}} / M \times P \times R \quad (\text{IV.1}), \text{ где}$$

$W_{i\text{Caf}}$  – массовая доля кофеина в испытуемой пробе в пересчете на сухое вещество, %;

$C_i$  – массовая концентрация кофеина в растворе  $i$ -ой пробы, мг/мл, вычисляется по градуировочной зависимости, исходя из среднего значения площади пика;

$V_{\text{гидр}}$  – объем гидролизата, мл (в данном случае 50 мл);

$M$  – масса пробы растворимого кофе или напитка, г (в данном случае 0,5 г);

$P$  – массовая доля сухого вещества, %;

$R$  – степень извлечения кофеина на стадии пробоподготовки, % (равна 85 %).

## ***IV.2. Количественный анализ углеводов***

### **IV.2.1. Приготовление элюента для хроматографического анализа**

Приготовить смесь ацетонитрил-вода (75:25 об.долей), отмеряя растворители разными мерными цилиндрами, профильтровать смесь через мембранный фильтр с размером пор не более 0,5 мкм и дегазировать любым способом (*элюент Б.*).

### **IV.2.2. Подготовка хроматографической системы**

Собрать систему, включающую изократический хроматограф, снабженный ручным или автоматическим инжектором с петлей объемом 50 мкл, и рефрактометрический детектор. Установить колонку Диасфер-110-Амин и прокачивать *элюент Б* со скоростью 0,8 мл/мин до стабилизации базовой линии детектора.

### IV.2.3. Градуировка хроматографической системы

При градуировке хроматографической системы использовать рабочие растворы смеси глюкозы и ксилозы с концентрациями 1,3-0,13 мг/мл и 0,3-0,03 мг/мл, соответственно.

Для приготовления рабочих растворов исходный СО (п. IV.1.4) развести в 10 раз смесью ацетонитрил-вода (84:16 об.долей). При последующих разведениях использовать *элюент Б*.

Градуировку хроматографической системы производить в соответствии с процедурой, описанной в п. IV.1.3., однако объем вводимой пробы должен быть не менее 100 мкл. Ориентировочные времена удерживания составляют 10 мин и 16 мин для ксилозы и глюкозы, соответственно.

### IV.2.4. Количественный анализ углеводов

Ввести в стабилизированную хроматографическую систему 100 мкл **фракции углеводов** не менее 2 раз. После записи хроматограммы идентифицировать по временам удерживания и определить площади пиков ксилозы и глюкозы. С использованием градуировочных зависимостей рассчитать массовую концентрацию ксилозы и глюкозы во **фракции углеводов** и по формуле (IV.2) – их содержание в исходном продукте.

$$W_{i \text{ XIGI}} = 1,25 \times 10^3 \times C_i \times V_{\text{гидр}} / M \times P \times R \quad (\text{IV.2}), \text{ где}$$

$W_{i \text{ XIGI}}$  – массовая доля ксилозы или глюкозы в испытуемой пробе в пересчете на сухое вещество, %;

#### IV. Порядок проведения количественного анализа

---

$C_i$  – массовая концентрация ксилозы или глюкозы в растворе  $i$ -ой пробы, мг/мл, вычисляется по градуировочной зависимости, исходя из среднего значения площади пика;

$V_{\text{гидр}}$  – объем гидролизата, мл (в данном случае 50 мл);

$M$  – масса пробы растворимого кофе или напитка, г (в данном случае 0,5 г);

$P$  – массовая доля сухого вещества, %;

$R$  – степень извлечения углевода на стадии пробоподготовки, % (для глюкозы  $R=80$  %, для ксилозы  $R=75$  %).

Сравнить полученные по формулам IV.1 и IV.2 результаты с нормативными значениями, приведенными в ГОСТ Р 51881-2002 и использовать эти данные для сертификации растворимого кофе и кофепродуктов.

Разработал: \_\_\_\_\_ /Васяров Г.Г./

\_\_\_\_\_ /Алексеева Г.С./

“ ” \_\_\_\_\_ 2003 г.

Закрытое Акционерное Общество “БиоХимМак СТ”

Россия, 119899, Москва, Воробьевы горы

тел. (095) 939-59-67; 939-58-06 /офис/, 939-36-66 /лаборатория/

факс (095) 939-59-67.

[www.bcmst.ru](http://www.bcmst.ru) info@bcmst.ru