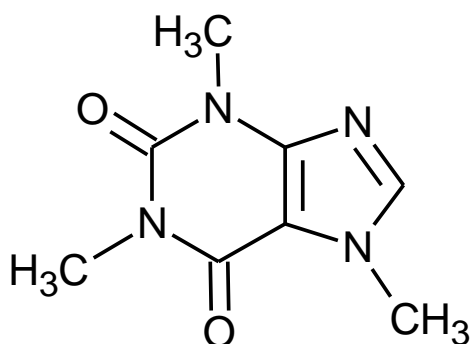


Spektrofotometryczne oznaczanie zawartości kofeiny w naparach i napojach

Oznaczanie kofeiny

Kofeina (3,7-dihydro-1,3,7-trimetylo-1H-puryno-2,6-dion) znana również pod nazwą 1,3,7-trimetyloksantyna jest alkaloidem purynowym o wzorze $C_8H_{10}N_4O_2$ i masie molowej 194,19 g/mol. W stanie czystym występuje w postaci białego proszku o temperaturze topnienia $237^{\circ}C$. Dobrze rozpuszcza się w gorącej wodzie, chloroformie i benzenie. Jest gorzka w smaku. W budowie jest zbliżona do dwóch innych alkaloidów purynowych: teobrominy i teofiliny.



Kofeina zbudowana jest z dwóch pierścieni: pierwszym sześciowęglowym, drugim natomiast pięciowęglowym, w których po dwa atomy węgla zastąpione zostały atomami azotu. Każdy atom azotu w pierścieniu sześciowęglowym połączony jest wiązaniem pojedynczym z grupą metylową $-CH_3$, pozostałe wolne atomy węgla połączone są wiązaniem podwójnym z atomem tlenu. W drugim pierścieniu natomiast tylko jeden z atomów azotu połączony jest wiązaniem pojedynczym z grupą metylową $-CH_3$.

Kofeina jest alkaloidem, czyli związkiem organicznym pochodzenia roślinnego, zawierającym układ cykliczny z atomami azotu w pierścieniu. Alkaloidy wykazują silne działanie fizjologiczne na organizm człowieka, niejednokrotnie toksyczne.

Występuje w wielu roślinach, m.in. w herbacie, kawie, guaranie, orzeszkach cola. Kofeina jest silnym stymulatorem centralnego układu nerwowego, przyspiesza przemianę materii, pobudza wydzielanie soku żołądkowego, zwiększa sprawność myślenia, zmniejsza zmęczenie psychiczne i fizyczne oraz wykazuje słabe działanie moczopędne. Kofeina stosowana jest w lecznictwie, głównie w postaci łatwo rozpuszczalnych soli. Stosowana jest m.in. w przypadku ostrych zatruc' alkoholem, w zapaściach, przy chorobach zakaźnych oraz niedociśnieniu. Stężenie kofeiny w filiżance kawy może wynosić' od 2 do 115 mg, w zależności od sposobu

przygotowania. Maksymalna, doustna dawka kofeiny wynosi 1,5 g, a dawka śmiertelna 10–12 g.

Celami ćwiczenia są:

1. poznanie podstawowych technik przygotowania próbek do analizy chromatograficznej: ekstrakcji w układzie ciecz- ciecz (LLE- *Liquid Liquid Extraction*) oraz ekstrakcji do ciała stałego (SPE – *Solid Phase Extraction*)
2. oznaczenie stężenia kofeiny w ekstraktach wybranych kaw, herbat i innych naparów bądź napojów zawierających kofeinę

1. Odczynniki, sprzęt i aparatura

- ❖ zlewki o pojemności 250 ml,
- ❖ kolby miarowe o pojemności 1, 5 i 25 ml,
- ❖ spektrofotometr,
- ❖ kuweta kwarcowa,
- ❖ waga,
- ❖ pipety,
- ❖ kolbki miarowe
- ❖ rozdzielacz,
- ❖ kolumnienki SPE
- ❖ chloroform
- ❖ metanol
- ❖ octan amonu
- ❖ 1M roztwór NaOH
- ❖ kwas octowy,
- ❖ roztwór wzorcowy kofeiny
- ❖ herbata, kawa

2. Przygotowanie roztworów roboczych

Roztwór przemywający: woda amoniakalna (0,3 mol/l) / metanol , 90+10 mieszanina objętościowa:

11 ml (2 ml 25%NH₃ x H₂O + 8ml H₂O + 1ml MeOH),

Rozpuszczalnik wymywający do kolumny SPE

metanol/woda/kwas octowy 75:25:1, mieszanina objętościowa:

(7,5ml MeOH + 2.5 ml H₂O +0.1ml CH₃COOH),

3. Wykonanie oznaczenia:

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Przygotować roztwór wyjściowy kofeiny o stężeniu 25 mg/ 25 ml. Następnie poprzez kolejne rozcieńczenia roztworu wyjściowego sporządzić roztwory o stężeniach: 40 µg/10 ml, 80 µg/10 ml, 120 µg/10 ml, 160 µg/10 ml i 200 µg/ 10 ml. Zmierzyć absorbancję przygotowanych roztworów przy długości fali 276 nm., a następnie sporządzić krzywą wzorcową.

Uwaga: w przypadku oznaczania kofeiny w ekstraktach otrzymanych techniką SPE, krzywą wzorcową przygotować stosując jako rozpuszczalnik metanol, zaś w ekstrakcji ciecz-ciecz chloroform. Dla metanolu absorbancję mierzyć dla 269 nm.

Przygotowanie badanej próbki herbaty (kawy) na drodze ekstrakcji ciecz-ciecz

Na wadze analitycznej odważyć do zlewki ok. **0.1 g herbaty (0,2 g kawy)**, zalać 100 ml gorącej wody destylowanej, przykryć szkiełkiem zegarkowym i pozostawić do zaparzenia na 20 min. Napary herbaty (kawy) przesączyć przez sączek bibułowy. Pobrać **10 ml** przesącza i przenieść do rozdzielacza, następnie doprowadzić pH do 13 za pomocą roztworu NaOH (dodać 1 ml roztworu o stężeniu 1M). Zalkalizowany napar herbaty (kawy) ekstrahować trzema kolejnymi porcjami chloroformu (10 ml; 5 ml; 5 ml). Każdorazowo wytrząsać przez 1 minutę i pozostawiać do rozwarstwienia na 5 minut. Warstwę organiczną z wyekstrahowaną kofeiną zbierać do kolbki miarowej o pojemności 25 ml. Na koniec kolbkę uzupełnić do kreski chloroformem. Zmierzyć absorbancję przygotowanych ekstraktów przy długości fali 276 nm.

Uwaga: w przypadku oznaczania kofeiny w coca-coli do ekstrakcji należy pobrać 10 ml odgazowanego napoju. Pozostałe etapy ekstrakcji są takie same jak dla herbaty i kawy.

Przygotowanie badanej próbki kawy/herbaty na drodze ekstrakcji do ciała stałego

Na wadze analitycznej odważyć do zlewki ok. 0.1000 g herbaty (0,2 g kawy), zalać 100 ml gorącej wody destylowanej, przykryć szkiełkiem zegarkowym i pozostawić do zaparzenia na 20 min. Napary herbaty przesączyć przez sączek bibułowy.

Etapy ekstrakcji:

I. Przygotowanie kolumny do ekstrakcji techniką SPE

1. przemyć kolumnę 5 ml MeOH, nie pozwalając, aby złożo wyschło,

2. następnie czynność przemywania powtórzyć, używając 5 ml H₂O, również nie dopuszczając do wyschnięcia złoża.

II. Absorpcja kofeiny

1. Pobrać, do zlewki o pojemności 25 ml, **2 ml przesączonego naparu herbaty**, dodać 5 ml wody destylowanej i 1 mL 1M NaOH. Otrzymany roztwór wprowadzić na kolumnę,

III. Usuwanie niepożądanych związków chemicznych

1. odmierzyć 2,5 ml wody amoniakalnej i przepuścić przez kolumnę, powtórzyć czynność, używając ponownie 2,5 ml roztworu,

IV. Suszenie złoża

1. pozostawić kolumnę przez okres 20 minut

V. Wymywanie kofeiny

1. pod kolumną umieścić fiolkę o objętości 8 ml,
2. Wymyć zaadsorbowaną kofeinę 5 ml mieszaniny wymywającej (woda/metanol/kwas octowy),

VI. Oznaczenie końcowe

Zmierzyć absorbancję przygotowanych ekstraktów przy długości fali 269 nm. Zawartość odczytać z krzywej wzorcowej.

4. Opracowanie wyników

1. Opisać tok analizy w badanej próbce.
- 2 Wyznaczyć zawartość kofeiny w 100g wyjściowego produktu (kawy lub herbaty).

Literatura:

1. Frankowski M., Kowalski A., Ociepa A., Siepak J., Niedzielski P.: *Kofeina w kawach i ekstraktach koleinowych i odkofeinowanych dostępnych na polskim rynku*. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, XLI, 1 (2008) 21-27.
2. Shufen Li, J. Berger, S. Hartland: *UV spectrophotometric determination of theobromine and caffeine in cocoa beans*. Analytica Chimica Acta, 232 (1990) 409-412.
3. Kłódka D., Bońkowski M., Telesiński A.: *Zawartość wybranych metyloksantyn i związków fenolowych w naparach różnych rodzajów herbat rozdrobnionych (dust i fannings) w zależności od czasu parzenia*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 1(56) (2008) 103-113.

4. Jagoda A., Dąbrowska B., Żukowski W., *Kofeina jako wskaźnik antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska – metody oznaczania*, Materiały konferencyjne: V Krakowska Konferencja Młodych Uczonych, Kraków 2010.
5. Filip L., Vlase L., Mindrutea I., Miere D., *Determination of caffeine by LC/MS from beverages*, Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica, L, 4b, 2005.
6. Srdjenovic B., Djordjevic-Milic V., Grujic N., Injac R., Lepojevic Z., Simultaneous HPLC determination of caffeine, theobromine and theophylline in food, drinks and herbal products, *Journal of Chromatographic Science*, 46 (2008) 144-149.
7. Jarosz M., Wierzejewska R., Mojska H., Świdorska K., Siuba M.: *Zawartość kofeiny w produktach spożywczych*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLII, 3 (2009) 776-781.
8. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo PWN, Warszawa 1996.