

# OZNACZANIE KOFEINY W PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH METODĄ HPLC

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

## PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ

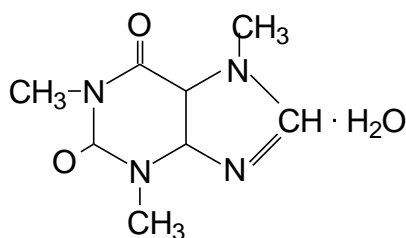
1. Przeczytaj uważnie instrukcję – zapoznaj się ze wstępem teoretycznym dotyczącym danej metody pomiarowej oraz dokładnie przeanalizuj czynności, które będą wykonywane na zajęciach.
2. Zwróć uwagę na zagrożenia związane ze stosowaniem odczynników chemicznych niezbędnych do wykonania ćwiczenia (karty charakterystyk).
3. Zastanów się:
  - czy potrafisz wyjaśnić podstawowe pojęcia dla stosowanej metody pomiarowej;
  - czy znasz nazewnictwo oraz wzory związków używanych podczas ćwiczenia;
  - czy potrafisz omówić budowę i działanie stosowanej aparatury pomiarowej;
  - czy umiesz dokonać obliczeń (w tym przeliczeń stężeń) koniecznych do prawidłowego wykonania ćwiczenia?

## 1. WSTĘP TEORETYCZNY

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości kofeiny w kawie, herbacie oraz coca-coli. Kofeinę oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej na odwróconej fazie.

### 1.1. Kofeina

Kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna) (1) jest alkaloidem wykrytym przez Rungego w 1820 r w ziarnach kawy, oraz przez Robiquetta, a następnie przez Pelletiera i Caventou w 1821 r.



(1)

Kofeina ma barwę białą, gorzkawy smak, nie posiada zapachu. Występuje w postaci białych, lekkich, igiełkowatych kryształów o jedwabistym połysku. Słabo rozpuszcza się w zimnej wodzie, bardzo dobrze w wodzie wrzącej. Temperatura topnienia postaci bezwodnej wynosi 234-237°.

## 1.2. Dobór eluentu w chromatografii

Rozdzielanie za pomocą chromatografii cieczowej zależy zarówno od fazy nieruchomej jak i ruchomej, czyli kolumny i rozpuszczalnika. Rozpuszczalnik odgrywa bardzo istotną rolę w dążeniu do maksymalnej sprawności chromatografii cieczowej. Dlatego bardzo ważnym jest dobór właściwego rozpuszczalnika. W doborze jego decydują dwa aspekty: praktyczny i optymalizacja zdolności rozdzielczej (czyli uzyskanie optymalnych czasów rozdzielania). Dokonując wyboru rozpuszczalnika (eluentu), stawia się przed nim następujące wymagania:

- 1) nie powinien działać szkodliwie na wypełnienie kolumny i przyrząd,
- 2) powinien dobrze rozpuszczać analizowaną mieszaninę,
- 3) musi on umożliwiać detekcję analizowanych składników mieszaniny,
- 4) w chromatografii preparatywnej powinien on umożliwiać łatwe oddzielenie go od obecnej w nim substancji, po wymyciu z kolumny chromatograficznej.

Przy doborze eluentu do rozwiązania konkretnego zadania analitycznego należy wziąć pod uwagę jego siłę elucyjną. Jest to związane z tym, że cząsteczki eluentu „rywalizują” o miejsce na powierzchni fazy stacjonarnej z cząsteczkami substancji rozdzielanej. Im oddziaływanie cząsteczek z powierzchnią fazy nieruchomej jest silniejsze, tym łatwiej wypierają one z powierzchni cząsteczki substancji rozdzielanej. Dlatego siłę elucji eluentu można charakteryzować wielkością siły oddziaływania jego cząsteczek z powierzchnią sorpcji. Oczywiście jest więc, że siła elucyjna eluentu zależy od rodzaju fazy stacjonarnej. W celu ułatwienia wyboru właściwego rozpuszczalnika jako eluentu chromatograficznego rozpuszczalniki ułożono w szeregi eluotropowe.

W przypadku podanych faz stacjonarnych (np. żelu krzemionkowego lub tlenku glinu) w jednym z szeregów eluotropowych rozpuszczalniki są ułożone według rosnącej mocy eluowania następująco: n-pentan, n-heksan, cykloheksan, tetrachlorek węgla, toluen, benzen, eter dietylowy, chloroform, dichlorometan, tetrahydrofuran, dichloroetan, aceton, octan etylu, acetonitryl, pirydyna, etanol, metanol, woda i kwas octowy.

Moc elucji przy rozdzielaniu chromatograficznym na niepolarnej fazie stacjonarnej (np. węglowej) jest odwrotna i wzrost mocy elucji można obserwować w szeregu: woda, metanol, etanol, aceton, propanol, eter dietylowy, butanol, octan etylu, n-heksan i benzen. Miara mocy elucyjnej rozpuszczalników są indeksy polarności.

O wyborze odpowiedniego rozpuszczalnika decyduje również detektor. W przypadku detektora refraktometrycznego wpływ ma współczynnik załamania światła, a w przypadku

detektora nadfioletowego - granica, przy której rozpuszczalnik staje się nieprzezroczysty dla nadfioletu.

Do optymalnego rozdzielania składników mieszanin nie wystarczy często pojedynczy rozpuszczalnik i należy stosować ich mieszaniny.

Skład mieszaniny może być jednakowy przez cały czas rozdzielania chromatograficznego, wówczas jest to elucja izokratyczna. Dodanie nawet małych ilości domieszek do ustalonego składu fazy ruchomej może powodować zmianę kolejności elucji rozdzielanych substancji.

Jeżeli skład fazy ruchomej zmienia się podczas rozdzielania chromatograficznego, wówczas mówimy o elucji gradientowej (jest ona analogiczna do programowania temperatury w chromatografii gazowej). Podczas rozdzielania składników jednej próbki z użyciem elucji gradientowej, następuje zmiana składu eluentu, a jego siła eluotropowa zwiększa się. Zmiana składu mieszaniny może zachodzić liniowo, albo może przebiegać skokowo.

## **CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA**

### **3. Odczynniki i aparatura**

- chromatograf cieczowy firmy Agilent Technologies z detektorem spektrofotometrycznym,
- kolumna ZORBAX SB C-18 (150 × 4,6 mm, 5 μm),
- faza ruchoma: 25% acetonitryl/75% kwas octowy o stężeniu 0,1%,
- roztwór standardowy kofeiny o stężeniu 10 mg/ml,
- roztwór roboczy kofeiny 2 mg/ml,
- kawa,
- herbata,
- coca-cola
- naczynka chromatograficzne o pojemności 1,5 ml,
- probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml,
- pipety automatyczne.

#### **Wymagane środki ostrożności**

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.

- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008):
  - Kofeina (toksyczność ostra, Doustnie (Kategoria 4), H302)
  - Kwas octowy (substancje ciekłe łatwopalne (Kategoria 3), H226; działanie żrące na skórę (Podkategoria 1A), H314; poważne uszkodzenie oczu (Kategoria 1), H318)
  - Acetonitryl (substancje ciekłe łatwopalne (Kategoria 2), H225; toksyczność ostra, doustnie (Kategoria 4), H302; toksyczność ostra, wdychanie (Kategoria 4), H332; toksyczność ostra, Skórnice (Kategoria 4), H312; działanie drażniące na oczy (Kategoria 2), H319)
- ✓ Pierwsza pomoc:
  - w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody z mydłem.
  - w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
  - w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
  - w przypadku połknięcia NIE prowokować wymiotów. Nieprzytomnej osobie nigdy nie podawać nic doustnie. Wyplukać usta wodą. Zasięgnąć porady medycznej.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

## **4. Wykonanie oznaczenia**

### 4.1. Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej

Przygotować roztwór roboczy kofeiny o stężeniu 2 mg/ml, a następnie sporządzić roztwory o stężeniach: 0,02 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,15 mg/ml (po 2 próbki na każdą wartość stężenia) poprzez rozcieńczenie roztworu roboczego w naczynku chromatograficznym.

Zarejestrować chromatogram każdego wzorca, zanotować czas retencji i pole powierzchni uzyskanego sygnału (piku).

### 4.2. Przygotowanie i analiza próbki kawy

Odważyć 2 łyżeczki kawy na wadze analitycznej – zanotować masę próbki. Przygotowaną naważkę zaparzyć w 250 ml wody destylowanej. Następnie przygotowaną

próbkę kawy ostudzić, przesączyć i rozcieńczyć 20-krotnie w naczynku chromatograficznym. Zarejestrować chromatogram substancji badanej. Analizę powtórzyć dwukrotnie. W celu identyfikacji piku kofeiny, próbkę zaszczyć roztworem wzorcowym kofeiny o danym stężeniu i poddać analizie. Z uzyskanych chromatogramów odczytać czas retencji i pole powierzchni uzyskanego sygnału (piku).

#### 4.3. Przygotowanie i analiza herbaty

Odważyć łyżeczkę herbaty na wadze analitycznej – zanotować masę próbki. Przygotowaną naważkę zaparzyć w 250 ml wody destylowanej. Następnie przygotowaną próbkę herbaty ostudzić, przesączyć i rozcieńczyć 10-krotnie w naczynku chromatograficznym. Zarejestrować chromatogram substancji badanej. Analizę powtórzyć dwukrotnie. W celu identyfikacji piku kofeiny, próbkę zaszczyć roztworem wzorcowym kofeiny o danym stężeniu i poddać analizie. Z uzyskanych chromatogramów odczytać czas retencji i pole powierzchni uzyskanego sygnału (piku).

#### 4.4. Przygotowanie i analiza coca-coli.

Przygotować próbkę coca-coli odgazować i rozcieńczyć 1:1 w naczynku chromatograficznym. Zarejestrować chromatogram substancji badanej. Analizę powtórzyć dwukrotnie. W celu identyfikacji piku kofeiny próbkę zaszczyć roztworem wzorcowym kofeiny o danym stężeniu i poddać analizie. Z uzyskanych chromatogramów odczytać czas retencji i pole powierzchni uzyskanego sygnału (piku).

## 5. Opracowanie wyników

W sprawozdania należy:

- a) sprecyzować cele ćwiczenia;
- b) opisać dokładnie czynności wykonywane na zajęciach z uwzględnieniem ilości stosowanych odczynników,
- c) czytelnie przedstawić otrzymane wyniki (w formie tabel, rysunków, wykresów – tytuł tabeli umieszczamy nad tabelą, z kolei tytuł rysunku lub wykresu umieszczamy pod rysunkiem);
- d) wykreślić krzywą kalibracyjną wykorzystując średnią wartość pola powierzchni z dwóch sygnałów (pików) roztworu wzorcowego kofeiny o danym stężeniu odczytanych z chromatogramów uzyskanych podczas analizy HPLC;
- e) podać równanie krzywej kalibracyjnej i wartość współczynnika korelacji;

- f) wykorzystując równanie krzywej kalibracyjnej wyznaczyć zawartość kofeiny w roztworach kawy, herbaty, coca-coli;
- g) obliczyć zawartość kofeiny w 1 g kawy i herbaty;
- h) omówić wyniki i wyciągnąć wnioski z przeprowadzonych eksperymentów.

## **Literatura**

1. Witkiewicz Z., „Podstawy chromatografii”, Wyd. 2., Warszawa WNT 1995.
2. Szczepaniak W., „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”, Warszawa 1996, PWN (rozdziały: 15 i 17).