

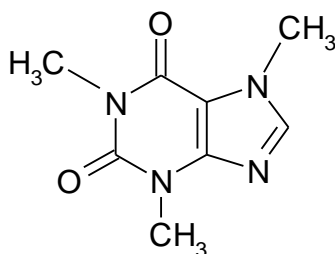
EKSTRAKCYJA KOFEINY Z PRÓBEK KAWY

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

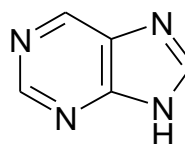
1. Wprowadzenie

1.1. Kofeina

Kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna) zwana również teiną jest pochodną puryny. W stanie czystym występuje w postaci białych, długich i giętkich kryształów, bez zapachu oraz o gorzkim smaku. Ulega odwodnieniu w temperaturze 80°C, topi się w temperaturze 234-239°C, a sublimuje w temperaturze 178°C.



kofeina



puryna

Kofeina jest naturalnym alkaloidem, znajdującym się w kawie, herbacie, liściach ostrokrzewu paragwajskiego Mate (*Ilexparaguariensis*), guarany (*Paulinuscupan*), orzeszkach cola i w mniejszych ilościach w kakao. Działa stymulująco na ośrodkowy układ nerwowy. Spożywana w umiarkowanych ilościach niweluje zmęczenie, poprawia nastrój i koncentrację oraz zwiększa wydolność fizyczną organizmu. Przeprowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że kofeina wpływa pozytywnie na konsolidację wspomnień i pamięć długotrwałą, zapobiega demencji i prawdopodobnie chorobie Alzheimerera. Kofeina spożywana jednak w nadmiernych ilościach powoduje uzależnienie fizyczne, choć słabsze niż np. nikotyna. W wyniku przyjmowania większych dawek tego alkaloidu występują objawy lekkiego przedawkowania, takie jak: zmęczenie, otępienie, mdłości, bóle głowy, zwiększone napięcie mięśni, zaburzenia snu czy arytmia serca.

Dawka śmiertelna kofeiny przy podaniu doustnym dla człowieka w zależności od wagi, wzrostu i indywidualnej wrażliwości na kofeinę wynosi ok. 150-200 mg na kilogram masy ciała. W praktyce jednak spożycie śmiertelnej dawki kofeiny zawartej w kawie czy herbacie przez człowieka nie jest możliwe, ponieważ kofeina jest metabolizowana przez

organizm szybciej niż jest możliwe wypicie tak dużej objętości płynu, a ponadto występujące objawy przedawkowania uniemożliwiają dalsze picie napoju.

1.2. Ekstrakcja i jej rodzaje.

Produktami większości reakcji organicznych są najczęściej mieszaniny wieloskładnikowe. Powszechnie stosowaną techniką rozdzielania i oczyszczania takich mieszanin jest **ekstrakcja**. Proces ten polega na wyodrębnieniu poszczególnych substancji lub grup związków chemicznych poprzez rozpuszczanie ich w odpowiednim rozpuszczalniku i oddzielenie w postaci roztworu od pozostałych składników próbki.

Wyróżnia się różne kryteria podziału metod ekstrakcji, np. ze względu na sposób prowadzenia procesu (periodyczna, ciągła) czy rodzaj układu ekstrakcyjnego (ciecz-ciecz, ciało stałe-ciecz).

Ekstrakcja periodyczna polega na rozdzieleniu substancji pomiędzy dwa nie mieszające się rozpuszczalniki ekstrahujące, wskutek wytrząsania obu warstw ciekłych, aż do osiągnięcia stanu równowagi pomiędzy stężeniami rozdzielanej substancji w obu warstwach. Ekstrakcję powtarza się wielokrotnie, a kolejne ekstrakty łączy ze sobą. Ekstrakcję periodyczną przeprowadza się w grubościennych rozdzielaczach cylindrycznych, bądź kulistych o podłużnym kształcie lub o kształcie gruszki. **Ekstrakcję ciągłą** stosuje się, aby ograniczyć objętość zużywanego do ekstrakcji rozpuszczalnika ekstrahującego w przypadku układów o małych współczynnikach ekstrakcji. Wadą tej techniki jest jednak bardzo duże zużycie ekstrahenta i odpowiednio małe średnie stężenie ekstraktu, będącego mieszaniną cieczy oraz zmniejszające się stężenia substancji ekstrahowanej. W przypadku **ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz** warunkiem prawidłowego przebiegu procesu jest występowanie dwóch faz ciekłych, które po zakończeniu procesu można łatwo rozdzielić mechanicznie. Technika ta polega na przenoszeniu substancji rozpuszczonej w jednej fazie ciekłej do drugiej fazy ciekłej, niemieszającej się z pierwszą. Kolejnym typem ekstrakcji jest **ekstrakcja w układzie ciało stałe-ciecz**. Polega ona na wyodrębnieniu z ciała stałego składnika rozpuszczającego się w odpowiednim rozpuszczalniku, np. związków organicznych z surowców roślinnych. Mechanizm prowadzenia tego typu ekstrakcji opiera się na wybiórczym rozpuszczaniu substancji znajdującej się w stałej próbce, toteż przenoszenie substancji do roztworu zależy głównie od jej rozpuszczalności w danym rozpuszczalniku. W większości przypadków ekstrakcja w układzie ciało stałe-ciecz jest czasochłonna, dlatego najbardziej korzystny jest ciągły sposób jej realizacji. Ponadto aby proces ten przebiegał właściwie, surowy materiał musi być specjalnie przygotowany, np. przez miażdżenie

i rozrywanie tkanki roślinnej. Najczęściej stosowanym aparatem do ekstrakcji w układzie ciało stałe-ciecz jest aparat Soxhleta.

1.3. Wydajność ekstrakcji

Z uwagi na to, iż efektywność procesu ekstrakcji zależy przede wszystkim od rodzaju rozpuszczalnika, przed przystąpieniem do wykonania procesu ekstrakcji niewątpliwie istotnym etapem jest dobór ekstrahenta. Najczęściej stosuje się rozpuszczalniki ekstrahujące takie jak: eter dietylowy lub eter diizopropylowy, benzen lub toluen, chloroform, chlorek metylenu i eter naftowy. Wybór ekstrahenta podyktowany jest rozpuszczalnością w nim substancji ekstrahowanej, łatwością usunięcia go z ekstraktu, ceną oraz łatwością rozwarstwiania się faz (pożądane jest, aby faza ekstrahowana i ekstrahująca charakteryzowały się niską wzajemną mieszalnością). Co jest niezwykle istotne, podczas ekstrakcji lepszą wydajność procesu uzyskuje się poprzez podzielenie rozpuszczalnika na kilka części aniżeli przy jednorazowym użyciu całej jego ilości. Duży wpływ na efektywność ekstrakcji ma również temperatura (najczęściej jej podwyższenie ułatwia rozpuszczenie większości substancji), intensywność mieszania substancji i ekstrahenta, rodzaj substancji, powierzchnia zetknięcia rozpuszczalnik-substancja oraz rozdrobnienie materiału.

Maceracja stanowi najprostszy przypadek ekstrakcji, w którym fazę stałą miesza się z rozpuszczalnikiem i sączy. Oznacza to, że wydajność ekstrakcji zwiększa się przez dokładne roztarcie stałej substancji (tak, aby posiadała jak największą powierzchnię), stosowanie nadmiaru rozpuszczalnika czy mieszanie.

2. Odczynniki i aparatura

- chromatograf HPLC firmy Hewlett Packard serii 1050 z detektorem UV
- kolumna ODS HYPERSIL 250 mm 4 mm, 5 m,
- faza ruchoma: 15% acetonitryl/85% bufor fosforanowy 0,04 mol/dm³ o pH =3,5
- prędkość przepływu 1 ml/min
- analityczna długość fali, $\lambda=276$ nm
- roztwór standardowy kofeiny 2 mg/ml
- kawa (ziarnista, mielona, bezkofeinowa)
- woda dejonizowana

3. Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu rozdrobnienia matrycy na wydajność i powtarzalność ekstrakcji kofeiny z próbek kawy.

3.1. Wyznaczenie prostej kalibracyjnej

Z uwagi na to, iż wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jest techniką pośrednią, konieczne jest wykonanie krzywej kalibracyjnej. W tym celu z roztworu standardowego kofeiny o stężeniu 2 mg/ml poprzez rozcieńczenie sporządzono roztwory o stężeniach: 0,02 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,15 mg/ml. Wyznaczono na tej podstawie równanie prostej kalibracyjnej.

3.2. Przygotowanie próbki kawy ziarnistej i wykonanie analizy

Do dwóch falkonów o pojemności 15 ml odważyć po dwa ziarenka kawy. Przygotowane naważki ekstrahować 10-krotnym nadmiarem wody dejonizowanej w ciągu 5 minut. Po zakończeniu procesu ekstrakcji przygotować próbki 10-krotnie rozcieńczone. W tym celu do dwóch probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodać 900 µl wody dejonizowanej i 100 µl ekstraktu kawy. Próbki dokładnie wymieszać, a otrzymane roztwory poddać analizie chromatograficznej wprowadzając 20 µl próbki na kolumnę chromatograficzną.

3.3. Przygotowanie próbki kawy mielonej i wykonanie analizy

Do dwóch probówek polipropylenowych o pojemności 3 ml odważyć około 0,1 g kawy mielonej. Przygotowane naważki ekstrahować 10-krotnym nadmiarem wody dejonizowanej w ciągu 5 minut. Po zakończeniu procesu ekstrakcji próbki odwirować przy 10 000 obr/min przez 5 minut. Następnie przygotować próbki 100-krotnie rozcieńczone. W tym celu do dwóch probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodać 990 µl wody dejonizowanej i 10 µl ekstraktu kawy. Próbki dokładnie wymieszać. Otrzymane roztwory poddać analizie chromatograficznej, wprowadzając 20 µl próbki na kolumnę chromatograficzną.

3.4. Przygotowanie próbki kawy bezkofeinowej i wykonanie analizy

Do dwóch probówek polipropylenowych o pojemności 3 ml odważyć około 0,1 g kawy bezkofeinowej. Przygotowane naważki ekstrahować 10-krotnym nadmiarem wody

dejonizowanej w ciągu 5 minut. Po zakończeniu procesu ekstrakcji próbki odwirować przy 10 000 obr/min przez 5 minut. Następnie przygotować próbki 10-krotnie rozcieńczone. W tym celu do dwóch probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodać 900 μ l wody dejonizowanej i 100 μ l ekstraktu kawy. Próbki dokładnie wymieszać. Uzyskane roztwory poddać analizie chromatograficznej, wprowadzając 20 μ l próbki na kolumnę chromatograficzną.

3.5. Przygotowanie próbki kawy parzonej i wykonanie analizy

Do dwóch zlewek odważono po około 3 g kawy mielonej. Przygotowane naważki zaparzone w 30 ml gorącej wody dejonizowanej (5 minut). Następnie po zakończeniu procesu ekstrakcji do dwóch probówek polipropylenowych o pojemności 3 ml przeniesiono około 2 ml ekstraktu. Próbki odwirowano przy 10 000 obr/min przez 5 minut. Po odwirowaniu przygotowano próbki 100-krotnie rozcieńczone. W tym celu do dwóch probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodano 990 μ l wody dejonizowanej i 10 μ l ekstraktu kawy. Próbki dokładnie wymieszano. Otrzymane roztwory poddano analizie chromatograficznej, wprowadzając 20 μ l próbki na kolumnę chromatograficzną.

4. Opracowanie wyników

1. Przygotować wstęp teoretyczny.
2. Wykorzystując równanie prostej kalibracyjnej, określić zawartości kofeiny we wszystkich badanych próbkach kawy (C_Z , C_M , C_B , C_P).
3. Uwzględniając odpowiednie rozcieńczenie każdej próbki, obliczyć stężenie roztworu kawy (ziarnistej, mielonej, bezkofeinowej i parzonej). Skorzystać z poniższych wzorów:

$$\text{kawa ziarnista:} \quad C_{\text{ek}(Z)} = C_Z \cdot 10$$

$$\text{kawa mielona:} \quad C_{\text{ek}(M)} = C_M \cdot 100$$

$$\text{kawa bezkofeinowa:} \quad C_{\text{ek}(B)} = C_B \cdot 10$$

$$\text{kawa parzona:} \quad C_{\text{ek}(P)} = C_P \cdot 100$$

4. Przyjmując stężenie roztworu kawy parzonej jako 100 %, obliczyć wydajności ekstrakcji dla poszczególnych próbek kawy.
5. Wyciągnąć wnioski z przeprowadzonego eksperymentu.

Literatura

1. P. Stepnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński, *Skrypt dla studentów „Techniki separacyjne”*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.
2. A. Czarny, B. Kawalek, A. Kolasa, P. Milart, B. Rys, J. Wilamowski *„Ćwiczenia laboratoryjne z chemii organicznej. Zasada bezpieczeństwa, aparatura i techniki laboratoryjne”*, Wydawnictwo Adamantan, Warszawa 2007-2008.