

OZNACZANIE KOFEINY W PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH METODĄ HPLC

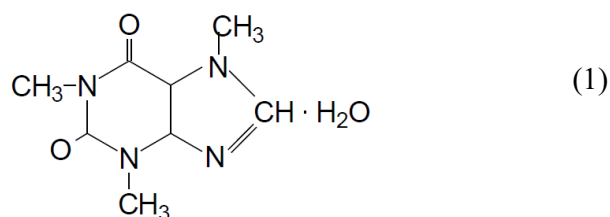
Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

1. Wprowadzenie

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości kofeiny w kawie, herbacie oraz coca-coli. Do oznaczania kofeiny zostanie wykorzystana technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączona z detekcją spektrofotometryczną. Analizy będą prowadzone w odwróconym układzie faz.

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.



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 °C.

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 retencji). 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 chromatografowanej. Im oddziaływanie cząsteczek z powierzchnią fazy nieruchomej jest silniejsze, tym łatwiej wypierają one z powierzchni cząsteczki substancji chromatografowanej. 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 chromatografowaniu na niepolarniej fazie stacjonarnej (np. węglowej tj. C-8, C-18) 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 spektrofotometrycznego - 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 chromatografowania, wówczas jest to elucja izokratyczna. Dodanie nawet małych ilości domieszek do ustalonego składu fazy ruchomej może powodować zmianę kolejności elucji chromatografowanych substancji. Jeżeli skład fazy ruchomej zmienia się podczas chromatografowania, 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.

3. Odczynniki i aparatura

- chromatograf cieczerwowy 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,

4. Wykonanie oznaczenia

4.1. Wyznaczenie prostej 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 poprzez rozcieńczenie roztworu roboczego. Przygotowane roztwory przelać do fiolek do HPLC i poddać analizie chromatograficznej. Z otrzymanych chromatogramów odczytać pola powierzchni pików lub wysokości pików kofeiny.

4.2. Przygotowanie i analiza próbki kawy

Odważyć 2 łyżeczki kawy. Przygotowaną naważkę zaparzyć w 250 ml wody destylowanej. Przygotowaną kawę, przesączyć i przygotować próbkę 20 krotnie rozcieńczoną. Przygotowane roztwory przelać do fiolek do HPLC i poddać analizie chromatograficznej. Z otrzymanych chromatogramów odczytać pola powierzchni pików lub wysokości pików kofeiny. W celu identyfikacji piku kofeiny, próbkę wzbogacić roztworem standardowym kofeiny i poddać ponownej analizie.

4.3. Przygotowanie i analiza herbaty

Odważyć łyżeczkę herbaty. Przygotowaną naważkę zaparzyć w 250 ml wody destylowanej. Tak przygotowaną herbatę ostudzić, przesączyć i przygotować próbkę 10- krotnie rozcieńczoną. Przygotowane roztwory przelać do fiolek do HPLC i poddać analizie chromatograficznej. Z otrzymanych chromatogramów odczytać pola powierzchni pików lub wysokości pików kofeiny. W celu identyfikacji piku kofeiny, próbkę wzbogacić roztworem standardowym kofeiny i poddać ponownej analizie.

4.4. Przygotowanie i analiza coca-coli.

Przygotować próbkę coca-coli odgazować i rozcieńczyć 1:1. Przygotowane roztwory przelać do fiolek do HPLC i poddać analizie chromatograficznej. Z otrzymanych chromatogramów odczytać pola powierzchni pików lub wysokości pików kofeiny. W celu identyfikacji piku kofeiny próbkę wzbogacić roztworem standardowym kofeiny i poddać analizie.

5. Opracowanie wyników

1. Przygotować wstęp teoretyczny.
2. Opisać tok analizy.
3. Na podstawie otrzymanych wyników z analizy roztworów standardowych wykreślić prostą kalibracyjną i wyznaczyć równanie prostej.
4. Na podstawie prostej określić zawartości kofeiny w roztworach kawy, herbaty, coca-coli.
Obliczyć, ile kofeiny znajduje się w jednej szklance kawy i herbaty.
4. Obliczyć zawartość kofeiny w 1 g ziaren kawy i liści herbaty.

Literatura:

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