



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych z Analizy Żywności

Ćwiczenie 3

Oznaczanie zawartości kofeiny w herbatce techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym (HPLC-UV/Vis)

Gdańsk, 2024



1. Wprowadzenie

W skład produktów żywnościowych oprócz białek wchodzi również niebiałkowe związki azotowe (**NPN** – *non protein nitrogen*), do których należą m.in. wolne aminokwasy, peptydy, kwasy nukleinowe, nukleotydy i ich produkty metabolizmu, a także alkaloidy. Ich zawartość zależy od rodzaju żywności, warunków i stadium rozwoju organizmu stanowiącego surowiec żywnościowy, czasu i sposobu przechowywania surowca po zbiorze, a także od sposobu obróbki surowca.

1.1. Definicja, budowa i właściwości fizykochemiczne alkaloidów

Alkaloidy stanowią jedną z najbardziej zróżnicowanych grup **metabolitów wtórnych** (związków organicznych, które nie są bezpośrednio niezbędne do wzrostu i rozwoju organizmu) występujących w organizmach żywych. Jest to klasa związków organicznych (najczęściej heterocyklicznych), która została pogrupowana razem ze względu na obecność przynajmniej jednego zasadowego atomu azotu. W porównaniu z większością innych klas związków naturalnych, alkaloidy charakteryzują się dużą różnorodnością strukturalną. Klasyfikacja tych związków opiera się głównie na podobieństwie szkieletu węglowego lub prekursora biochemicznego.

Wyróżnić można zatem cztery podstawowe grupy alkaloidów:

- alkaloidy pochodzące od aminokwasów (np. ornityny, argininy, lizyny, histydyny, fenyloalaniny, tyrozyny, tryptofanu, kwasu antranilowego i kwasu nikotynowego),
- alkaloidy purynowe (np. kofeina),
- pochodne steroidów i terpenoidów z atomem wbudowanym w pierścień (np. solanina),
- pochodne poliketydów (np. koniina lub kokcinellina).

Większość alkaloidów jest słabymi zasadami, jednakże część z nich wykazuje właściwości amfoteryczne (np. teobromina i teofilina). Zwykle są bezbarwnymi ciałami stałymi, choć część z nich może być lotnymi cieczeniami (np. nikotyna), bądź posiadać barwę (np. berberyna (żółta) i sangwinaryna (pomarańczowa)). Łatwo rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych, natomiast słabo w wodzie.

1.2. Występowanie i aktywność biologiczna alkaloidów

Chociaż alkaloidy tradycyjnie izolowano z roślin, występują one również w organizmach zwierząt, owadów, bezkręgowców i mikroorganizmów wodnych. W roślinach związki te mogą pełnić rolę **atraktantów** (czynników wabiących), zapewniających zapylenie (kolor kwiatów, zapach i nektar), bądź stanowić część skomplikowanego systemu obrony chemicznej. Większość

alkaloidów to związki fizjologicznie czynne, wykazujące różnorodne działanie toksyczne o szerokim spektrum działania, od mikroorganizmów po kręgowce.

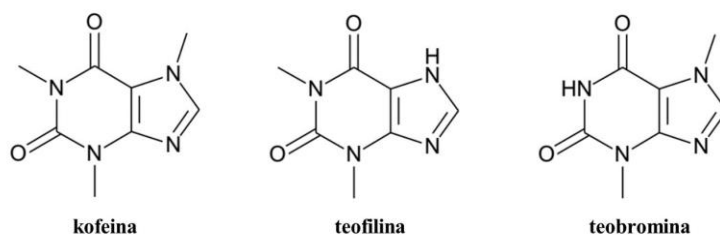
Alkaloidy od wieków były wykorzystywane przez człowieka jako składniki leków, naparów, czy mikstur, ze względu na swoją aktywność farmakologiczną, w tym przeciwmalaryczną (np. chinina), przeciwastmatyczną (np. efedryna), przeciwnowotworową (np. homoharringtonina), przeciwarrytmiczną (np. chinidyna), przeciwbakteryjną (np. chelerytryna) i przeciwbólową (np. morfina). Mogą również wykazywać działanie psychoaktywne (np. psylocyna) i działać jak stymulanty (np. kokaina, kofeina, teobromina).

1.3. Kofeina

1.3.1. Budowa i właściwości fizykochemiczne kofeiny

Kofeina (3,7-dihydro-1,3,7-trimetylo-1H-puryno-2,6-dion), znana również pod nazwą 1,3,7-trimetyloksantyna, jest związkiem chemicznym o masie molowej 194,19 g/mol. W stanie czystym tworzy białe, długie, giętkie kryształy o temperaturze topnienia 237°C i o gęstości 1,2 g/cm³. 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 –CH₃, 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 –CH₃. Struktury alkaloidów herbaty przedstawiono na Rysunku 1.



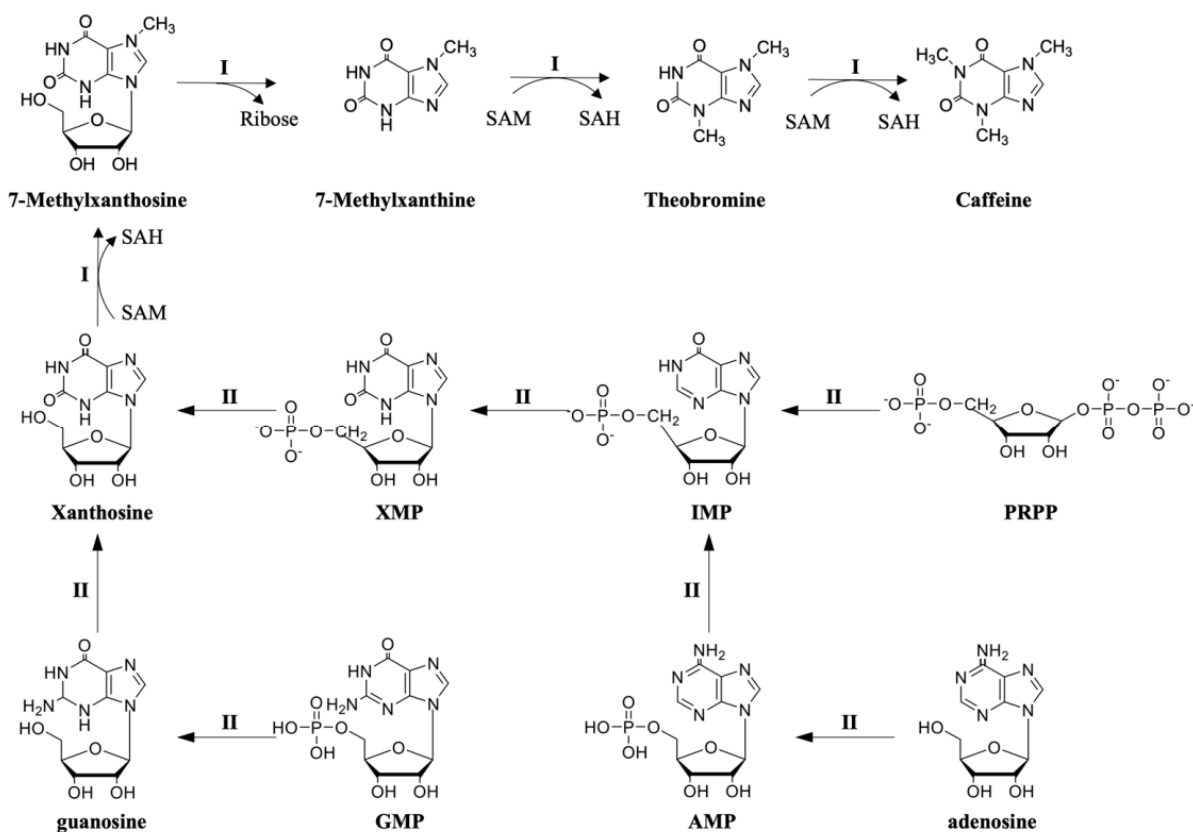
Rysunek 1. Struktury kofeiny, teofiliny i teobrominy.

Ze względu na układ pierścieni oraz ilość atomów azotu w każdym w nich kofeinę zaliczamy do pochodnych puryny, heterocyklicznego, aromatycznego związku organicznego, który składa się z fragmentów pirydyny i imidazolu. Związek ten w czystej postaci nie jest szeroko rozpowszechniony w przyrodzie, lecz pełni bardzo istotną rolę w każdym żywym organizmie, gdyż

stanowi podstawę adeniny i guaniny, dwóch zasad azotowych wchodzących w skład kwasów nukleinowych (DNA i RNA).

1.3.2. Biosynteza kofeiny

Podstawowy szlak syntezy kofeiny można podzielić na cztery etapy, które obejmują trzy reakcje metylacji katalizowane przez trzy różne typy *N*-metylotransferaz i jedną reakcję nukleozydazy katalizowaną przez *N*-metylonukleozydazę. Specyficzny szlak to: *ksantozyna* → *7-metyloksantozyna* → *7-metyloksantyna* → *teobromina* → *kofeina* (ścieżka I, Rysunek 2), gdzie ksantozyna służy jako substrat. Pierścień purynowy kofeiny pochodzi głównie z nukleotydów purynowych, a donorem grupy metylowej biorącym udział w procesie metylowania jest *S*-adenozyl-L-metionina (SAM).



Rysunek 2. Ścieżka biosyntezy kofeiny.

1.3.3. Źródła kofeiny

Najbardziej rozpowszechnionymi źródłami kofeiny są nasiona krzewu kawy (*Coffea* L.) i liście herbaty (*Camellia*, L.). Znaczne ilości kofeiny można również znaleźć w guaranie (*Paulinia cupana*), liściach ostrokrzewu paragwajskiego (*Ilex paraguariensis*, A.St-Hil.) oraz nasionach kakaowca (*Theobroma cocoa*, L.). Innymi źródłami kofeiny są również przytulia czepna (*Galium aparine*, L.), chinowiec (*Cinchona* L.) i pomelo (*Citrus maxima*, Burm. f.). Zawartość kofeiny w różnych gatunkach roślin zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Zawartość kofeiny w wybranych gatunkach roślin.

Nazwa łacińska	Nazwa zwyczajowa	Zawartość kofeiny w suchej masie [%]
<i>Camillia sinensis</i>	Herbata	2,8 ^a
<i>Camillia assamica</i>	Herbata „asam”	2,4 ^a
<i>Coffea arabica</i>	Kawa „arabica”	1,0 ^b
<i>Coffea canephora</i>	Kawa „robusta”	1,9 ^b
<i>Theobroma cacao</i>	Kakao	2,5 ^c
<i>Ilex paraguariensis</i>	Yerba mate	0,9 ^d
<i>Paulinia cupana</i>	Guarana	4,3 ^c
<i>Citrus maxima</i>	Pomelo	0,9 ^e

^a młode liście; ^b dojrzałe nasiona; ^c liścienie; ^d dojrzałe liście; ^e pylnik

1.3.4. Wpływ kofeiny na organizm człowieka

Kofeina do krwi dostaje się z przewodu pokarmowego. Jest wchłaniana już po około 30 - 45 minutach po jej spożyciu. Czas utrzymywania się jej we krwi to w przybliżeniu 4 godziny (w zależności od organizmu może się on wahać od 2 do 10 godzin). Kofeina jest stymulatorem centralnego układu nerwowego, łatwo przenika z krwi do mózgu, a tam ze względu na swoje znaczne podobieństwo w budowie do adenozyiny wiąże się z receptorami adenozyinowymi i blokuje je. Adenozyina jest substancją naturalnie występującą w organizmie człowieka, która pośredniczy w aktywności mózgu, wpływając na stan snu i czuwania. W konsekwencji podnosi się aktywność dopaminy. Dopamina jest to neuroprzekaźnik, który odpowiada za większość efektów kawy takich jak poprawę koncentracji, zmniejszenie uczucia senności. Blokowanie receptorów adenozyinowych może również wpłynąć na kurczenie się naczyń krwionośnych, co oddziałuje na napięcie naczyń znajdujących się w mózgu, a tym samym zmniejszyć objawy migreny oraz bólów głowy innego



Analiza Żywności

3. Oznaczanie zawartości kofeiny w herbacie techniką HPLC-UV/Vis

pochodzenia. Te właściwości kofeiny wykorzystane zostały przez producentów leków, którzy stosują ją jako istotny składnik leków przeciwbólowych.

Spożywanie kofeiny może spowodować ogólne polepszenie koordynacji organizmu oraz poprawienie koncentracji. Jednakże zbyt duża dawka kofeiny może mieć negatywny wpływ na funkcjonowanie organizmu powodując uczucie zmęczenia lub zaburzenia koordynacji ruchowej. Dawki powyżej 2000 mg mogą również powodować bezsenność, drżenie mięśni lub przyspieszenie oddechu. Częste picie napojów, których składnikiem jest kofeina może także przyczynić się do podniesienia się ciśnienia tętniczego krwi, a tym samym przyspieszenia bicia serca, gdyż powoduje ona uwalnianie się kortyzolu i adrenaliny, które są odpowiedzialne za występowanie takich efektów. Kofeina również posiada właściwości moczopędne, powoduje zwiększenie wydzielania kwasu żołądkowego oraz prowadzi do przyspieszenia metabolizmu.



2. Część eksperymentalna

2.1. Cel ćwiczenia

Ćwiczenie polega na oznaczaniu zawartości kofeiny w liściach herbaty za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym (HPLC-UV/Vis).

2.2. Odczynniki, akcesoria laboratoryjne i aparatura

a) Odczynniki:

- Roztwór podstawowy kofeiny o stężeniu 1 mg/ml (10 mg kofeiny rozpuszczone w 10 ml mieszaniny metanol:woda (1:4, v/v))
- woda amoniakalna (25%) – 10 ml
- metanol cz.d.a. – 250 ml
- kwas octowy cz.d.a. – 10 ml
- metanol do HPLC, odgazowany – 1 l
- woda „ultraczysta”, odgazowana – 1 l
- metanol do mycia strzykawki – 50 ml

b) Akcesoria laboratoryjne:

- kolumna do SPE, Oasis HLB – 2 szt.
- kolba miarowa 10 ml – 10 szt.
- zlewka 100 ml – 2 szt.
- zlewka 250 ml 0 1 szt.
- kolby stożkowe z korkiem 250 ml – 3 szt.
- pipeta szklana 10 ml – 3 szt.
- pipeta szklana 5 ml. – 2 szt.
- pipeta szklana 2 ml. – 1 szt.
- pipeta szklana 1 ml – 1 szt.
- pipeta automatyczna + tipsy 1 ml
- cylinder miarowy 50 ml – 1 szt.
- pipety Pasteura
- strzykawka do HPLC 100 μ l
- łopatką
- pompka do SPE



- wialki 4 ml – 10 szt.
- lejek i sączki średnie – 2 szt.
- bagietka szklana

c) Aparatura analityczna

Chromatograf cieczowy Shimadzu DGU-20A5R (Shimadzu, Kyoto, Japonia) z detektorem spektrofotometrycznym SPD-20A (Shimadzu) wyposażony w kolumnę analityczną Gemini NX-C18 o wymiarach 150x4,6 mm i grubości ziaren 5µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

2.3. Przygotowanie roztworów

- a) *Roztwór przemywający* - mieszanina do wymywania zanieczyszczeń z kolumny SPE, przygotowana w stosunku objętościowym: $\text{NH}_3 : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH}$ (2 : 8 : 1, v/v/v).
- b) *Roztwór wymywający* – mieszanina do wymywania kofeiny z kolumny SPE, przygotowana w stosunku objętościowym: $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH}$ (15 : 5 : 0,2, v/v/v).
- c) *Mieszanina do sporządzania roztworów wzorcowych* – przygotowana w stosunku objętościowym: $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (1 : 4, v/v)

2.4. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

Z roztworu podstawowego kofeiny o stężeniu 1 mg/ml przygotować roztwory robocze do krzywej kalibracyjnej na sześciu poziomach stężeń: 0,001 mg/ml, 0,0025 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,025 mg/ml i 0,05 mg/ml.

2.5. Ekstrakcja kofeiny z liści herbaty

- odważyć 0,1 g herbaty oraz 0,4 g MgO
- umieścić próbkę herbaty i MgO w kolbie o pojemności 250 ml, dodać 100 ml wrzącej wody dejonizowanej i odczekać 10 minut.
- pozostawić ekstrakt do odstania się osadu
- przesączyć ekstrakt przez sączek bibułowy

2.6. Oczyszczanie kofeiny za pomocą SPE

a) *Kondycjonowanie kolumny*

- pod kolumną umieścić zlewkę 100 ml
- przemyć kolumnę 5 ml MeOH, nie pozwalając, aby złoże wyschło



Analiza Żywności

3. Oznaczanie zawartości kofeiny w herbacie techniką HPLC-UV/Vis

→ przemyć kolumnę 5 ml H₂O, nie pozwalając, aby złożo wyschło

b) Naniesienie próbki

→ nanieść na złożo 2 ml przesączone ekstraktu kofeiny

c) Wymywanie zanieczyszczeń

→ przemyć kolumnę za pomocą 2,5 ml roztworu przemywającego

→ powtórzyć czynność, używając ponownie 2,5 ml roztworu przemywającego

→ przedmuchać kolumnę powietrzem

d) Wymywanie kofeiny

→ pod kolumną umieścić kolbę miarową (10 ml)

→ na kolumnę nanieść 7,5 ml mieszaniny wymywającej (porcjami)

→ poczekać aż rozpuszczalnik całkowicie spłynie z kolumny

→ uzupełnić kolbę do kreski za pomocą mieszaniny metanol:woda

e) Regeneracja złoża

→ pod kolumną umieścić zlewkę 100 ml

→ przemyć kolumnę 5 ml MeOH, nie pozwalając, aby złożo wyschło

→ przemyć kolumnę 5 ml H₂O, nie pozwalając, aby złożo wyschło

2.7. Analiza techniką HPLC-UV/Vis

Wykonać analizę oczyszczonych ekstraktów (po SPE) oraz roztworów wzorcowych. Warunki pracy chromatografu:

→ przepływ fazy ruchomej – 1 ml/min

→ długość fali $\lambda = 272$ nm

→ skład fazy ruchomej: MeOH : H₂O (30 : 70, v/v)

2.8. Opracowanie wyników

— na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy roztworów wzorcowych wykreślić wykres zależności odpowiedzi detektora od stężenia kofeiny w roztworze (wyznaczyć współczynnik determinacji (R^2) oraz równanie prostej)

— wykorzystując równanie prostej obliczyć stężenie kofeiny w ekstrakcie

— obliczyć zawartość kofeiny w herbacie, wynik wyrazić w mg kofeiny na 100 g produktu (mg/100g)



3. Literatura:

- Margaret F. Roberts, Michael Wink, “Alkaloids – biochemistry, ecology and medical applications”, Springer Science+Business Media, LLC, 1998
- George R. Walker, Edmund K. Nowacki, “Alkaloid biology and metabolism in plants” Springer, 1978
- Zdzisław E. Sikorski, “Chemia Żywności, Tomy 1-3”, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 1994, 2007
- Ashihara H., Sano H. Crozier A., „Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering”, *Phytochemistry*, 2008, 69, 841-856
- Bhambhani S., Kondhare K.R., Giri A.P., “ Diversity in chemical structures and biological Properties of plant alkaloids”, *Molecules*, 2021, 26, 3374
- Adamski Z., Blythe L.L., Milella L., Bufo S.A., “Biological activities of alkaloids: from toxicology to pharmacology”, *Toxins*, 2020, 12, 210
- Lin Z., Wei J., Hu Y., Pi D., Jiang M., Lang T. “ Caffeine Synthesis and its mechanism and application by microbial degradation – a review”, *Foods*, 2023, 12, 2721

4. Informacje dodatkowe

Zakres informacji, które student powinien umieć, aby móc uczestniczyć w zajęciach:

- definicja, budowa, właściwości fizykochemiczne, występowanie i aktywność biologiczna alkaloidów
- budowa, właściwości fizykochemiczne, biosynteza, występowanie i wpływ na organizm kofeiny
- metoda krzywej kalibracyjnej – definicję, sposób przygotowania, sposób obliczania
- technika SPE – definicję, etapy
- technika HPLC-UV/Vis – budowę, zasadę działania, podstawowe pojęcia i prawa (np. różnica między elucją gradientową, a izokratyczną, różnica między analizą ilościową, a jakościową, parametry retencji, prawo Lamberta-Beera, itd.)

Przydatna literatura:

- Literatura spisana w Rozdziale 3.
- Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z., „Techniki Separacyjne”, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, 2010