



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie 5

Analiza ilościowa kofeiny metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem
techniki HPLC-UV

Gdańsk, 2023

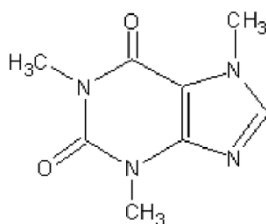


Metody Separacyjne

Analiza ilościowa kofeiny metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

I. Wprowadzenie

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.



Rysunek 1. Struktura chemiczna kofeiny

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. 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. 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 neuroprzebieznik, który odpowiada za większość efektów kawy takich jak poprawę koncentracji, zmniejszenie uczucia senności. Blokowanie receptorów adenozyinowych może również wpłynąć na kurczenie się naczyń



Metody Separacyjne

Analiza ilościowa kofeiny metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

krwionośnych, co oddziałuje na napięcie naczyń znajdujących się w mózgu, a tym samym zmniejszyć objawy migreny oraz bólów głowy innego 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.

Kofeina jest głównym alkaloidem nasion krzewu kawowego *Coffea arabica*. Występuje także w innych roślinach z rodzin *Theacei Sterculiaceae*. Kofeina znajduje się również w liściach herbaty (teina). Źródłami kofeiny są rośliny z rodziny Marzanowatych (*Rubiaceae*), między innymi przedstawiciel flory polskiej przytulia (*Galium*) czy chinowiec (*Cinchona*), oraz rodziny *Theacei Sterauliaceae*. Znaczne ilości kofeiny znaleźć możemy również w guaranie (*Pasta Guarana*), liściach mate (*Herba mate*) oraz w nasionach kawowca (*Theabroma cacao* L.).

Prawa absorpcji

Promieniowanie elektromagnetyczne, przechodząc przez roztwór, może ulegać: absorpcji, odbiciu i rozproszeniu. Natężenie wiązki padającej wyraża się wzorem:

$$I_0 = I_a + I_t + I_r$$

gdzie:

I_a - natężenie promieniowania zaabsorbowanego przez roztwór,

I_t - natężenie promieniowania przechodzącego przez roztwór,

I_r - natężenie promieniowania odbitego i rozproszonego.

Ponieważ pomiary absorpcji promieniowania wykonuje się najczęściej w stosunku do roztworu porównawczego (odnośnika), którego skład powinien być zbliżony do składu próbki i który znajduje się w identycznych kuwetach, promieniowanie odbite i rozproszone (I_r) w obu przypadkach jest



Metody Separacyjne

Analiza ilościowa kofeiny metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

jednakowe i może być pominięte. Roztwór odnośnika w warunkach pomiaru nie absorbuje promieniowania, gdyż nie zawiera substancji oznaczanej i można przyjąć, że natężenie wiązki promieniowania przechodzącej przez roztwór odnośnika jest równe natężeniu wiązki padającej na roztwór badanej próbki. Stosunek natężenia promieniowania przechodzącego przez próbkę (I_t) do natężenia promieniowania padającego na próbkę (I_o) (równego natężeniu promieniowania przechodzącego przez odnośnik), nazywamy transmitancją lub przepuszczalnością i oznaczamy:

$$T = \frac{I_t}{I_o}$$

Transmitancję najczęściej wyrażamy w procentach:

$$T = \frac{I_t}{I_o} \cdot 100\%$$

Może ona przybierać wartości od 0% do 100%.

Natężenie promieniowania zaabsorbowanego zależy od stężenia roztworu i od grubości warstwy absorbującej. Matematycznie zależność tę opisuje prawo Lamberta-Beera, które w postaci logarytmicznej przyjmuje postać:

$$A = \lg \frac{I_o}{I_t} = kcl$$

Logarytm dziesiętny stosunku natężenia wiązki promieniowania padającego na badaną próbkę (I_o) do natężenia wiązki promieniowania przechodzącego przez badaną próbkę (I_t) nazywany jest absorbancją. Przyjmuje ona wartości z przedziału od 0 do nieskończoności. Gdy stężenie roztworu (c) jest wyrażone w mol/dm^3 , a grubość warstwy (l) jest wyrażona w cm , współczynnik proporcjonalności k nosi nazwę molowego współczynnika absorpcji (ϵ , wyrażony w jednostce $\text{dm}^3/(\text{mol} \times \text{cm})$).

$$A = \epsilon l c$$

Jest to podstawowe prawo spektrofotometrii.

Zależność między absorbancją a transmitancją wyraża:

$$A = \lg \frac{1}{T}$$

lub gdy transmitancja jest wyrażona w procentach



Metody Separacyjne

Analiza ilościowa kofeiny metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

$$A = \lg \frac{100}{T}$$

Zależność odwrotną tj. transmitancji od absorbancji wyraża wzór:

$$T = \frac{1}{10^A}$$

a w procentach

$$T = \frac{100}{10^A}$$

Jeżeli w badanym roztworze znajduje się kilka składników, oznaczanie spektrofotometryczne można wykonać poprawnie tylko wtedy, gdy spełnione jest prawo addytywności absorbancji, wg którego absorbancja mieszaniny jest równa sumie absorbancji poszczególnych składników, a absorbancja pojedynczego składnika jest taka, jakby tylko on jeden znajdował się w badanej próbce. Matematycznie prawo to określają następujące wzory:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \sum_{i=1}^n A_i$$

$$A = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \dots + \varepsilon_n c_n l = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i l$$

a dla stężenia masowego:

$$A = a_1 \rho_1 l + a_2 \rho_2 l + \dots + a_n c \rho_n l = \sum_{i=1}^n a_i \rho_i l$$

gdzie:

A - absorbancja mieszaniny,

A₁, A₂, A_n - absorbancje poszczególnych składników,

c₁, c₂, c_n - stężenia molowe poszczególnych składników,

ε₁, ε₂, ε_n - molowe współczynniki absorpcji poszczególnych składników,

a₁, a₂, a_n - współczynniki absorpcji właściwej poszczególnych składników,

ρ₁, ρ₂, ρ_n - stężenia masowe poszczególnych składników.



Metody Separacyjne

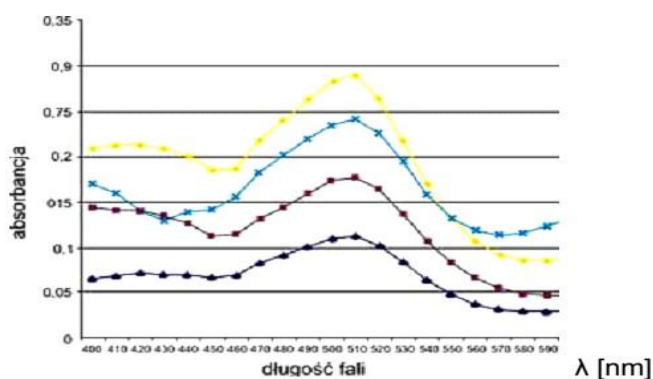
Analiza ilościowa kofeiny metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

Wybór długości fali i stężeń roztworów wzorcowych

W spektrofotometrii ilościowej należy dokonać wyboru:

- analitycznej długości fali przy której będą wykonane pomiary,
- odpowiednich stężeń substancji oznaczanej,
- metody pomiaru.

Analityczną długość fali λ wybiera się na podstawie krzywej absorpcji.



Rysunek 2. Krzywe absorpcji dla różnych związków

Pomiary wykonywane przy λ_{\max} odznaczają się największą dokładnością i czułością. Bardzo małe stężenia substancji barwnej w roztworze są oznaczane z dużym błędem, gdyż przepuszczalność roztworu badanego jest podobna do przepuszczalności roztworu odniesienia i najczęściej bliska 100 %. W przypadku intensywnie zabarwionych roztworów tylko mała część promieniowania przechodzi przez roztwór, co także powoduje zwiększenie wyników pomiaru. Przygotowując robocze roztwory wzorcowe przez rozcieńczenie wzorcowego roztworu podstawowego, najkorzystniej jest tak dobrać stężenia, aby otrzymać optymalny dla danego spektrofotometru zakres wartości mierzonej absorbancji. Najczęściej używany zakres wartości pomiarowych dla aparatów punktowych wynosi 0,2 - 0,8 wartości absorbancji.



Metody Separacyjne

Analiza ilościowa kofeiny metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

II. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest analiza ilościowa kofeiny metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki HPLC.

III. Wykonanie ćwiczenia

- Z wodnego roztworu podstawowego kofeiny o stężeniu **1 mg/ml** przygotować 6 roztworów roboczych o stężeniach wskazanych przez prowadzącego. Do rozcieńczeń używać wody.
- Wykonać widmo absorpcji wodnego roztworu kofeiny o stężeniu wskazanym przez prowadzącego w zakresie 190-300 nm wobec wody.
- Wykonać analizę HPLC roztworu kofeiny o stężeniu stosowanym podczas pomiaru widma, przy długościach fali wybranych jako charakterystyczne.
- Wybrać najbardziej optymalną długość fali i dwukrotnie wykonać analizy HPLC-UV 6 roztworów roboczych kofeiny.
- Wykreślić krzywą kalibracyjną, w tym równanie krzywej i współczynnik R^2 .
- Wykonać dwukrotnie analizę chromatograficzną napojów, uprzednio rozcieńczonych co najmniej 2-krotnie i odgazowanych na łaźni ultradźwiękowej. Wyznaczyć zawartość kofeiny w napojach korzystając z równania krzywej kalibracyjnej. Jeżeli wyznaczona zawartość nie mieści się w zakresie sporządzonej krzywej kalibracyjnej należy zaproponować inne rozwiązanie. Uzyskaną wartości podać w mg/100 ml i porównać z zawartością udostępnioną przez producenta napoju.
- Wyznaczyć instrumentalną granicę oznaczalności (LOQ, $\mu\text{g/ml}$) i wykrywalności metody (LOD, $\mu\text{g/ml}$), korzystając z poniższych równań:

$$LOQ = \frac{10xSD}{b}$$

$$LOD = \frac{3,3xSD}{b}$$

Gdzie:

b – wartość średnia wyrazu wolnego

SD – odchylenie standardowe wyrazu wolnego



Metody Separacyjne

Analiza ilościowa kofeiny metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

Warunki analizy HPLC-UV

- Kolumna Hypersil Gold C18_{aq}, 150x4 mm, 3 μm;
- Faza ruchoma: (B)Metanol/(A)Woda z dodatkiem TFA (0,0025%, v/v);
- Warunki izokratyczne: 30B:70A, v/v
- Przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min
- Długość fali: ustalona eksperymentalnie

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

- cylinder miarowy poj. 10 mL - 2 szt.,
- cylinder miarowy poj. 250 mL - 2 szt.,
- pipety o poj. 5 mL 4 szt.,
- pipety o poj. 2 mL 2 szt.,
- zlewka o pojemności 25 mL 2 szt.,
- strzykawki o poj. 50 i 100 μL
- buteleczki z ciemnego szkła o poj. 2 mL 15 szt.,
- buteleczki z ciemnego szkła o poj. 4 mL 2 szt.,
- butelki o poj. 500 mL 2 szt.,
- kolbka miarowa o poj. 10 mL 1 szt.,
- metanol,
- metanol do mycia strzykawki,
- woda destylowana z dodatkiem TFA (0,0025%, v/v),
- roztwór wzorcowy kofeiny o stężeniu 1 mg/ml,
- napoje gazowane,
- probówki szklane 2 szt

Literatura

1. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, PWN, W-wa, 1996.
2. Witkiewicz Z., Podstawy chromatografii, WNT, W-wa, 1995, 2005.
3. http://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/_nodes/strona-chemia/17430/files/slady_hplc_2.pdf