

3. Analiza kofeiny w produktach spożywczych lub pochodzenia naturalnego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Materiał analizowany: kawa, herbata, Pepsi, Coca-Cola, napój wysokoenergetyczny lub inne produkty zawierające kofeinę
2. Szkło laboratoryjne: rozdzielacz, cylindry miarowe, pipety miarowe, kolby płaskodenne, kolba okrągłodenna, lejek zwykły, małe zlewki, strzykawka Hamiltona
3. Probówki Eppendorfa
4. Bibuła filtracyjna
5. Bezwodny Na_2SO_4
6. Roztwory wzorcowe zawierający kofeinę rozpuszczoną w wodzie, o stężeniu 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,075 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,01 mg/mL
7. Kontrolny roztwór wzorcowy kofeiny o stężeniu 0,1 mg/mL
8. 0,2 M wodny roztwór NaOH
9. Dichlorometan
10. Roztwory do wysokosprawnej chromatografii cieczowej:
roztwór A: metanol
roztwór B: 0,08% wodny roztwór kwasu trifluorooctowego (TFA)
roztwór C: 0,08% roztwór TFA w acetonitrylu (ACN)
11. Wyparka rotacyjna próżniowa
12. Zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej składający się z degazera, pompy, detektora UV oraz komputera wraz z oprogramowaniem

Wykonanie doświadczenia:

A. Izolacja kofeiny

Odpowiednią ilość płynu (20 mL) zawierającego kofeinę umieścić w kolbie płaskodennej i dodać 15 mL dichlorometanu (DCM) oraz 15 mL 0,2 M roztworu NaOH. Tak przygotowaną mieszaninę wytrząsać przez 5 minut. Następnie mieszaninę przenieść do rozdzielacza i wytrząsać przez kolejne 5 min. Oddzielić warstwę organiczną i przenieść do uprzednio przygotowanego naczynia (kolba płaskodenna). Do warstwy wodnej w rozdzielaczu dodać 20 mL DCM i ponownie ekstrahować. Warstwy organiczne połączyć i osuszyć nad Na_2SO_4 . Po 15 minutach roztwór przesączyć do kolby okrągłodennej oraz usunąć rozpuszczalnik pod obniżonym ciśnieniem, a otrzymany osad rozpuścić w 20 mL dejonizowanej wody. Do czasu wykonania analizy HPLC próbkę przechowywać w temperaturze $+4^\circ\text{C}$.

B. Sporządzenie krzywej wzorcowej

W celu sporządzenia krzywej wzorcowej przeprowadzić analizy HPLC roztworów wzorcowych kofeiny otrzymanych przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego kofeiny o stężeniu 1 mg/mL do następujących stężeń: 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,1 mm/mL, 0,075 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL oraz 0,01 mg/mL. Na podstawie analizy pól powierzchni pików w otrzymanych chromatogramach wykreślić krzywą wzorcową przedstawiającą zależność powierzchni pików od stężenia wzorca. Otrzymana wartość współczynnika korelacji powinna być większa lub równa 0,995.

Warunki analizy:

- wysokosprawny chromatograf ciekłowy firmy Shimadzu składający się z degazera, pompy (czterokanałowa) i detektora UV
- kolumna Phenomenex PhenoSphere-Next C18 (5 μ m), o wymiarach 4,6×150 mm
- objętość dozowania: 10 μ L
- temperatura kolumny: 25°C
- faza ruchoma: gradient 10-60% roztworu C
- natężenie przepływu fazy ruchomej: 1 mL/min
- czas analizy: 15 min
- warunki detekcji: λ = 272 nm

C. Analiza chromatograficzna kofeiny w wybranych produktach spożywczych lub pochodzenia naturalnego

Przed rozpoczęciem właściwej analizy badanej próbki należy wykonać analizę chromatograficzną roztworu kontrolnego kofeiny o stężeniu 0,1 mg/mL i porównać zgodność wyniku z krzywą wzorcową. Otrzymany wynik powinien mieścić się w zakresie stężenia teoretycznego $\pm 20\%$. W wypadku braku zgodności wyniku należy przygotować nowe roztwory wzorcowe kofeiny oraz sporządzić nową krzywą wzorcową. Jeśli roztwór kontrolny spełnia powyższe kryterium wykonać analizę próbki posługując się tą samą metodą chromatograficzną jak dla roztworów wzorcowych i mieszaniny kontrolnej.

D. Przedstawienie wyników końcowych

Na podstawie czasów retencji zidentyfikować kofeinę w badanej próbce, a jej zawartość wyznaczyć na podstawie powierzchni pików, posługując się krzywą wzorcową. Wynik końcowy oznaczenia przedstawić w mg/L oraz w mg/wielkość porcji z dokładnością do 0,1.

Zakres materiału:

Podstawy teoretyczne chromatografii ciekłowej, zasada rozdziału w wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii ciekłowej, klasyfikacja, występowanie, właściwości alkaloidów, struktura i właściwości kofeiny.