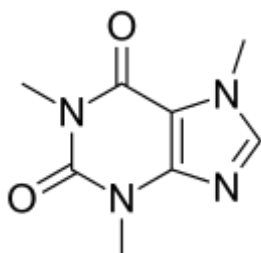


## Ćwiczenie 7 i 8.

### ZASTOSOWANIE ANALIZY SPEKTROFOTOMETRYCZNEJ UV-Vis DO OZNACZEŃ ILOŚCIOWYCH KOFEINY W NAPOJACH SPOŻYWCZYCH

#### WPROWADZENIE:

W ćwiczeniu zaproponowano metodę spektrofotometryczną do oznaczeń ilościowych kofeiny w kawie, herbacie oraz w różnych napojach orzeźwiających (coca-cola, napoje energetyzujące itp.) Kofeina jest alkaloidem purynowym, stąd też pochodzą jej nazwy systematyczne: 1,3,7-trimetylo-1*H*-puryno-2,6(3*H*,7*H*)-dion; 2,6-dihydroksypuryna=ksantyna; 1,3,7-trimetyloksantyna.



Kofeina należy do związków o silnym działaniu stymulującym centralny układ nerwowy. Z uwagi na obecność w popularnych napojach spożywczych typu kawa, herbata, napoje orzeźwiające należy do powszechnie stosowanych używek, często w sposób niekontrolowany (Tabela 1). Jest to związek uzależniający, podwyższający ciśnienie krwi, o działaniu moczopędnym. Kofeina stosowana jest w medycynie w leczeniu astmy oraz jako środek przeciwbólowy, w szczególności przeciwmigrenowy.

Spożywanie kofeiny może powodować poprawę koncentracji oraz odczucie lepszej koordynacji psychoruchowej. Zbyt duża dawka może jednak mieć negatywny wpływ na funkcjonowanie organizmu, prowadząc do zaburzeń motoryki lub powodując uczucie zmęczenia i senności. Spożycie kofeiny w dawce powyżej 2 g może powodować drżenie mięśni, przyspieszenie pracy serca, wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz bezsenność. Kofeina znana jest także z działania drażniącego na śluzówkę żołądka. Wspomaga wydzielanie kwasu żołądkowego. Może prowadzić do przyspieszonego metabolizmu, stąd jej obecność w preparatach wspomagających odchudzanie.

Kofeina jest związkiem toksycznym. Podana doustnie śmiertelna dawka dla dorosłego człowieka wynosi 10 g.

Alkaloid ten występuje w wielu roślinach między innymi w : liściach herbaty, ziarnach kawy, liściach kamelii chińskiej, ostrokrzewu paragwajskiego (*yerba mate*), owocach guarany czy w orzeszkach coli. Jest to substancja biała, o połyskujących igiełkowatych kryształach. Charakteryzuje się stosunkowo niską rozpuszczalnością w wodzie o temperaturze pokojowej (2.1 g/100 g; 25°C) oraz ponad dwukrotnie wyższą, gdy temperatura wody wynosi 40°C (4.6 g/100 g). Rozpuszczalność w etanolu i chloroformie w 25°C wynosi odpowiednio: 1.05 g/100 g oraz 12.5 g/100 g. Bezwodna kofeina topi się w temperaturze 234-237°C. Masa molowa wynosi 194,19 g/mol.

Tabela 1 Zawartość kofeiny w różnych produktach spożywczych [1,2]

Produkt	Masa produktu/porcja	Zawartość kofeiny [mg]	Zawartość kofeiny [mg/L]
Czekolada gorzka	43 g	31	
Czekolada mleczna	43 g	10	
Herbata zielona	177 mL	30÷81	169÷450
Herbata czarna	177 mL	18÷107	100÷594
Kawa parzona	207 mL	80÷135	386÷652
Red Bull	250 mL	80	320
Coca-Cola	355 mL	34	96
Espresso	45÷60 mL	100	1691÷2254

### CEL ĆWICZENIA:

Celem ćwiczenia jest ekstrakcja oraz oznaczenie stężenia kofeiny w wybranych produktach spożywczych. Identyfikacja ilościowa przeprowadzona zostanie na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej w wyniku pomiarów wartości absorbancji chloroformowych roztworów kofeiny o znanym stężeniu. Pomiar wartości absorbancji wykonuje się w maksimum długości fali wynoszącym 276 nm. Obecność grupy karbonylowej, układu wiązań podwójnych oraz atomów azotu w cząsteczce tego alkaloidu odpowiada za absorpcję promieniowania UV.

### ODCZYNNIKI I APARATURA

1. napój zawierający kofeinę (kawa, herbata, Coca-Cola, Tiger itp.)
2. roztwór podstawowy kofeiny (2 g/L)
3. zlewka 250 mL ze szkiełkiem zegarkowym
4. zlewka 150 mL
5. pipeta jednomiarowa 10 mL
6. 3 M roztwór NaOH
7. chloroform
8. kolbka miarowa 25 mL
9. 5 kolbek miarowych 10 mL
10. pipetor (100  $\mu$ l ÷ 1 mL)
11. rozdzielacz 250 mL
12. spektrofotometr UV-Vis
13. kuweta kwarcowa

[1] Daniel S. Groisser. A study of caffeine in tea. „The American journal of clinical nutrition”. vol. 31 no. 10, s. 1727–1731, 1978

[2] Caffeine Content of Beverages, Foods, & Medications. The Vaults of Erowid, 2006-07-07. [dostęp 2009-08-03].} oraz dane z Wikipedii

## OPIS WYKONANIA ĆWICZENIA

### **Przygotowanie próbek:**

#### **A. Analiza próbki kawy**

1. Odważyć na wadze analitycznej ok. 0.2000 g kawy. Przygotowaną naważkę przenieść do zlewki na 250 mL i zaparzyć w 100 mL wrzącej, destylowanej wody. Zlewkę przykryć szkiełkiem zegarkowym i pozostawić do zaparzenia na ok. 20 minut. Tak sporządzony napar przesączyć. Za pomocą papierka wskaźnikowego sprawdzić pH roztworu. Jeśli roztwór jest kwaśny należy go zalkalizować. W roztworach kwaśnych kofeina występuje bowiem w formie sprotonowanej, tworząc dobrze rozpuszczalne w wodzie sole, co znacznie ogranicza efektywność ekstrakcji. Za pomocą 3 molowego NaOH zalkalizować roztwór doprowadzając wartość pH do ok. 12-13.

10 mL zasadowego naparu przenieść do rozdzielacza i ekstrahować trzema porcjami chloroformu (10 mL, 5 mL, 5 mL). Prowadzenie ekstrakcji w trzech porcjach umotywowane jest dążeniem do zwiększenia wydajności ekstrakcji. W procesie separacji wykorzystuje się różnicę w podziale kofeiny pomiędzy dwie niemieszające się fazy: chloroform i wodę. Ponieważ w przybliżeniu współczynnik podziału kofeiny pomiędzy  $\text{CHCl}_3$  i wodę wynosi 9,

$$k = \frac{[\text{kofeina}]_{\text{CHCl}_3}}{[\text{kofeina}]_{\text{H}_2\text{O}}} = 9$$

oznacza to, że użycie w pierwszym kroku jednakowych objętości wody i chloroformu spowoduje transfer 90 % kofeiny zawartej w wodnym roztworze do roztworu  $\text{CHCl}_3$ . Uwaga! Ekstrakcja prowadzona w roztworach kwaśnych zmniejsza współczynnik podziału do ok. 2.

Po dodaniu każdej porcji chloroformu mieszaninę należy wytrząsać przez około 1 minutę, a następnie pozostawić do rozwarstwienia. Połączone ekstrakty chloroformowe przenieść do kolby na 25 mL. Kolbę uzupełnić do kreski chloroformem.

#### **B. Analiza próbki herbaty**

Odważyć na wadze analitycznej ok. 0.2000 g herbaty. Przygotowaną naważkę przenieść do zlewki na 250 mL i zaparzyć w 100 mL wrzącej, destylowanej wody. Zlewkę przykryć szkiełkiem zegarkowym i pozostawić do zaparzenia na ok. 20 minut. Tak sporządzony napar przesączyć. Za pomocą papierka wskaźnikowego sprawdzić pH roztworu. Roztwór powinien być zasadowy (pH=12-13). Jeśli tak nie jest za pomocą 3 molowego NaOH zalkalizować roztwór. 10 mL zasadowego naparu przenieść do rozdzielacza i ekstrahować trzema porcjami chloroformu (10 mL, 5 mL, 5 mL).

Po dodaniu każdej porcji chloroformu mieszaninę należy wytrząsać przez około 1 minutę, a następnie pozostawić do rozwarstwienia. Połączone ekstrakty chloroformowe przenieść do kolby na 25 mL. Kolbę uzupełnić do kreski chloroformem.

#### **B. Analiza próbki napoju gazowanego typu Coca-Cola**

W celu pozbycia się dwutlenku węgla ok. 25 mL napoju podgrzewać, w obecności kamyków wrzennych, przez około 10 minut na płycie grzejnej. Za pomocą jednomiarowej pipety pobrać 10 mL zimnego, odgazowanego napoju, przenieść do rozdzielacza. Wobec papierka wskaźnikowego,

korzystając z 3 M roztworu NaOH zalkalizować roztwór do wartości pH ok. 12. Zasadowy roztwór ekstrahować podobnie jak w przypadku naparów kawowych i herbacianych.

### Wykonanie oznaczenia:

#### 1. Sporządzenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego, otrzymanego od laboranta, przygotować 5 roztworów wzorcowych. W tym celu do kolb miarowych o pojemności 10 mL pobrać odpowiednią ilość roztworu podstawowego tak, aby stężenia kofeiny wynosiły odpowiednio : 0.02 mg/mL, 0.06 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.2 mg/mL. Zarejestrować widma roztworów wzorcowych kofeiny w zakresie 250 do 300 nm. stosując jako odnośnik chloroform. Dla każdego z widm odczytać wartość maksimum absorpcji przy  $\lambda_{\max}=276$  nm oraz przy 300 nm (tło). Obliczyć wartość absorpcji kofeiny ( $Abs_{\lambda_{\max}}-Abs_{tło}$ ). Wykreślić na papierze milimetrowym krzywą wzorcową.

#### 2. Analiza roztworów badanych

Zmierzyć widmo absorpcji analizowanych roztworów. Analogicznie jak dla roztworów wzorcowych wyznaczyć absorpcję roztworu i w oparciu o krzywą wzorcową określić zawartość kofeiny w analizowanej próbce (mg/100 g).

Tabela 2

KW [mg/mL]	$Abs_{\lambda_{\max}}$
0.02	
0.06	
0.1	
0.15	
0.2	

### Opracowanie wyników:

1. Obliczyć zawartość kofeiny w próbce, wyrażoną w gramach na 100 g suchej masy ( w przypadku próbek stałych) oraz w g/L dla próbek ciekłych.
2. Dokonać oceny skuteczności procedury wyodrębniania kofeiny w odniesieniu do danych literaturowych lub producenckich.
3. Dokonać oceny użyteczności i skuteczności zastosowanej w ćwiczeniu metody dla użytych próbek spożywczych.

### MATERIAŁ DO OPANOWANIA

1. Spektroskopia UV-Vis
2. Metody ekstrakcyjne