

CHEMIA ANALITYCZNA ZAAWANSOWANA

(chemia, studia II stopnia, I rok, I semestr)

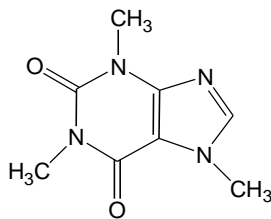
ĆWICZENIE: SPEKTROFOTOMETRYCZNE OZNACZANIE KOFEINY W KAWIE I NAPOJACH ENERGETYZUJĄCYCH

(Opracowała: dr Marta Hryniewicka)

Uwaga: Studenci są proszeni o przyniesienie na laboratorium dowolnego napoju energetyzującego.

Kofeina jest jednym z alkaloidów zaliczanych do pochodnych puryny (związku zawierającego człon pirymidynowy oraz imidazolowy). Substancją podstawową zasad purynowych jest ksantyna.

Kofeina (rys. 1) jest głównym alkaloidem nasion krzewu kawowego *Coffea arabica*, *Coffea liberica* i in., występuje w ilości około 1,5%. Bogate w ten składnik są liście herbaty (ok. 1%), orzeszki cola, pepsi, coca - cola, a także coraz bardziej popularne napoje energetyzujące.



Rys.1. Wzór strukturalny kofeiny ($C_8H_{10}N_4O_2$, $M = 194,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

1,3,7-trimetyloksantyna lub 3,7-dihydro-1,3,7-trimetylo-1H-puryno-2,6-dion

Kofeina po spożyciu jest gwałtownie wchłaniana i metabolizowana, maksymalne stężenie we krwi występuje po ok. godzinie. Kofeina rozmieszcza się w tkankach proporcjonalnie do ich uwodnienia, nie ulega kumulacji, a jej biologiczny okres półtrwania wynosi 2,5 - 4,5h.

Działanie kofeiny, zaliczanej do analeptyków, polega na pobudzeniu ośrodkowego układu nerwowego oraz ośrodka oddechowego. Poza tym pobudza równomiernie korę mózgową, zwiększa sprawność myślenia, znosi zmęczenie psychiczne i fizyczne, przyspiesza przemianę materii, zwiększając zapotrzebowanie na tlen, eliminuje senność, podtrzymuje wysiłek intelektualny. Nadmierne spożywanie produktów zawierających w swym składzie kofeinę może doprowadzić do uzależnienia. Pobudzenie psychiczne i ruchowe połączone z drżeniem mięśni i niemiernym biciem serca jest konsekwencją zbyt dużego stężenia kofeiny we krwi. Dawka śmiertelna wynosi 0,12g/kg wagi ciała.

Napoje energetyzujące (energy drink) od kilku lat cieszą się rosnącą popularnością na naszym rynku. Ze względu na ich specyficzne działanie skierowane są głównie do kierowców, ludzi aktywnych fizycznie, uprawiających sporty ekstremalne. Działanie energy drinków w znacznym stopniu różni się od działania typowych napojów orzeźwiających. Podstawowe ich zadanie można określić jako dodanie energii lub odświeżenie umysłu. Efekt ten osiągnięty zostaje dzięki obecności substancji o działaniu pobudzającym - stąd nazwa „energetyzujące”. Nie należy mylić tych napojów z napojami izotonicznymi, które zawierają odpowiednio dobrane składniki mineralne czy też napojami węglowodanowymi, które są źródłem energii w postaci węglowodanów. Substancje decydujące o właściwościach napojów energetyzujących to substancje biologicznie aktywne: kofeina, tauryna, inozytol, guarana, glukuronolakton, karnityna oraz odpowiednie witaminy (głównie z grupy B). W niektórych energy drinkach znajdziemy również wyciągi roślinne, np. z żeń-szenia, miłorzębu japońskiego czy innych egzotycznych roślin.

Aparatura, sprzęt i odczynniki:

- Spektrofotometr UV/VIS, U-1900, Hitachi, Japonia;
- Kuwety kwarcowe o grubości 10 mm;
- Waga laboratoryjna, RADWAG WPS 210/C/2, Polska;
- Młynek;
- Płyta grzejna;
- Zestaw do sączenia (statyw, lejek ilościowy, sączki);
- Zestaw do ekstrakcji ciecz – ciecz (10 rozdzielaczy);
- Naczynka wagowe (2szt.);
- Łyzeczka do ważenia;
- Krystalizator (2szt.);
- Szkiełka zegarkowe (3szt.);
- Kolby miarowe o pojemności: 10mL (1szt.), 50mL (8szt.), 100mL (2szt.), 500mL (1szt.);
- Probówki miarowe o pojemności 10 lub 15mL z korkami szklanymi (10szt.);
- Probówki miarowe o pojemności 20mL z korkami szklanymi (3szt.);
- Pipety miarowe: 2mL (1szt.), 5mL (2szt.), 10mL (3szt.), 25mL (3szt.);
- Zlewki: 25mL (1szt.), 50mL (3szt.), 100mL (3szt.), 600mL (1szt.);
- Kofeina;
- Tlenek magnezu MgO;
- Dichlorometan CH₂Cl₂;
- 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄.

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest wydzielenie i oznaczenie zawartości kofeiny w kawie rozpuszczalnej, prażonych ziarnach kawy oraz napojach energetyzujących np. Tiger, M-Power itp. metodą spektrofotometrii w nadfiolecie.

Wykonanie ćwiczenia:

A: Oznaczenie zawartości kofeiny w kawie rozpuszczalnej

Przygotowanie krzywej wzorcowej:

- 1) Przygotować wodny roztwór podstawowy kofeiny o stężeniu 1,2mg·mL⁻¹ rozpuszczając odpowiednią ilość naważki w 100mL wody.
- 2) W kolbce na 50mL przygotować wodny roztwór roboczy kofeiny o stężeniu 0,6mg·mL⁻¹.
- 3) Do 8 kolb miarowych o pojemności 50mL odmierzyć: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4mL roztworu roboczego kofeiny, uzupełnić wodą do kreski i dokładnie wymieszać.
- 4) Obliczyć stężenia (mg·mL⁻¹ oraz mol·L⁻¹) przygotowanych roztworów wzorcowych.

Przygotowanie badanej próbki:

- 1) Odważyć 0,4 g kawy rozpuszczalnej i wsypać do kolby miarowej o poj. 500mL.
- 2) Dopełnić wodą redestylowaną i wymieszać.
- 3) Do zlewki o pojemności 500mL odmierzyć: 25mL przygotowanego roztworu kawy, 25mL 0,05M roztworu H₂SO₄ (wcześniej sporządzonego poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu 0,5 M), 200mL wody.
- 4) Zawartość zlewki nakryć szkiełkiem zegarkowym i gotować 20 minut.
- 5) Dodać (powoli!) 12,5g tlenku magnezu.
- 6) Wymieszać bagietką i ogrzewać przez dalsze 20 minut.
- 7) Roztwór ochłodzić i przesączyć.

Wykonanie oznaczeń spektrofotometrycznych:

Zarejestrować widma roztworów wzorcowych oraz przygotowanej próbki metodą spektrofotometrii UV – VIS w zakresie 200 – 400nm wobec wody redestylowanej jako odnośnika.

B: Oznaczenie zawartości kofeiny w prażonych ziarnach kawy i napojach energetyzujących

Przygotowanie krzywej wzorcowej:

- 1) Do 8 rozdzielaczy wprowadzić po 10mL roztworów wzorcowych przygotowanych do poprzedniej krzywej wzorcowej.
- 2) Dodać 5mL dichlorometanu i zawartość rozdzielacza wytrząsać przez 2 minuty.
- 3) Po rozdzieleniu faz dolną warstwę organiczną przenieść do probówki miarowej na 10mL, a do wodnej warstwy dodać drugą porcję dichlorometanu i przeprowadzić ekstrakcję wytrząsając przez ok.2 minuty.
- 4) Połączyć ekstrakty i w razie potrzeby uzupełnić probówki dichlorometanem do objętości końcowej równej 10mL.
- 5) Zmierzyć absorbancję roztworów wzorcowych stosując dichlorometan jako odnośnik.

Przygotowanie próbki ziarna:

Ziarna kawy prażonej (ok. 10 sztuk) rozdrobnić w młynku. Odważyć 0,2g rozdrobnionych ziaren kawy i umieścić w krystalizatorze. Przeprowadzić dwukrotną ekstrakcję ($2 \times 10\text{mL CH}_2\text{Cl}_2$).

Uwaga: ekstrakcja powinna trwać co najmniej 20 minut. Podczas ekstrakcji krystalizator powinien być przykryty szkiełkiem zegarkowym.

Połączyć ekstrakty, zmierzyć absorbancję i wyznaczyć stężenie kofeiny w badanej próbce. Stosując odpowiednie założenia obliczyć zawartość kofeiny w filiżance kawy o pojemności 150mL.

Przygotowanie próbki napoju energetyzującego:

- 1) Pobrać 5 mL napoju energetyzującego i przenieść do kolby miarowej o pojemności 100 mL, dodać 5 kropel 0,05 M roztworu H_2SO_4 . Kolbę uzupełnić wodą redestylowaną do kreski i dokładnie wymieszać.
- 2) Zawartość kolby przenieść do zlewki i ogrzewać na płycie grzejnej przez 15 minut.
- 3) Pobrać 10 mL ostudzonego roztworu i przeprowadzić dwukrotną ekstrakcję ($2 \times 10\text{ mL CH}_2\text{Cl}_2$). Zmierzyć absorbancję, a następnie wyznaczyć stężenie kofeiny. Uzyskany wynik porównać z stężeniem kofeiny podanej na etykiecie produktu. Obliczyć błąd względny.

Wymagania:

- 1) Alkaloidy ze szczególnym uwzględnieniem kofeiny.
- 2) Właściwości, mechanizm działania i metody oznaczania kofeiny.
- 3) Metody wydzielania analitów.
- 4) LLE i parametry charakteryzujące ten typ ekstrakcji.

Literatura:

- 1) Belay A., Ture K., Redi M., Asfaw A. (2008). *Measurement of caffeine in coffee beans with UV/VIS spectrometer*. Food Chemistry 108, 310 – 315.
- 2) Nebesny E., Budryn G. (2000). *Charakterystyka ziarna kawowego*. Chemia spożywcza i biotechnologia (Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej) z.62, nr 832, 85 – 99 (do wglądu u prowadzącego ćwiczenie).
- 3) Kohlmünzer S., (2000). *Farmakognozja*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- 4) Mandel H.G. (2002). *Update on caffeine consumption, disposition and action*. Food and Chemical Toxicology 40, 1231 – 1234.