

Název: Stanovení kofeinu v čaji a kávě metodou HPLC-UV

Návod na práci

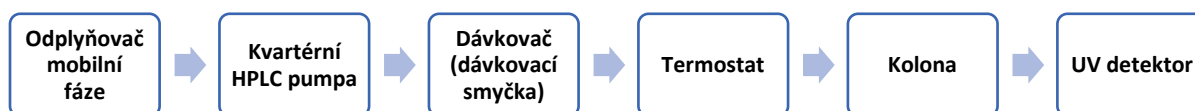
Zadání:

1. Metodou HPLC-UV zjistíte přítomnost kofeinu ve vzorcích kávy nebo čaje na základě srovnání chromatografických elučních charakteristik složek vzorku a referenční látky.
2. Metodou kalibrační křivky určíte koncentraci kofeinu.

Teorie

Kofein je alkaloid ze semen kávovníku, avšak nachází se i v jiných rostlinách. Má povzbuzující účinky na centrální nervovou soustavu a používá se jako součást mnoha povzbuzujících nápojů (např. v kolových nápojích). Odvar z pražených semen kávovníku – káva – je oblíbeným nápojem po celém světě, zejména díky obsahu kofeinu. Je to návyková látka.

Cílem práce je stanovení kofeinu v nápojích. Kofein se ze vzorku extrahuje metodou extrakce na tuhé fázi (SPE) a následná analýza se provede pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na obrácených fázích s mobilní fází methanol:voda. K detekci kofeinu se použije spektrofotometrický detektor při vlnové délce 270 nm. Analýza se provede pomocí systému HPLC, který se skládá z několika modulů:



Pomůcky: HPLC zařízení, zařízení na extrakci na tuhé fázi, analytické váhy, navažovací lodička, kádinka (100 ml), odměrný válec, tyčinka, filtrační papír, filtrační nálevka, laboratorní stojan, odměrná baňka (250 ml), odměrné baňky (25 ml, 6 ks), Pasteurová pipeta, automatické pipety, vialka na zachytávání extraktu, SPE kolonky (C18-oktadecyl), mikrostříkačka

Chemikálie: standardní roztok kofeinu ve vodě (98 %), chemikálie pro přípravu mobilní fáze a extrakci (acetonitril, methanol), vzorek (čaj, instantní káva), roztok NaNO₂ k určení mrtvého elučního času ($c = 0,1$ mg/ml), deionizovaná voda, roztok pro promývání dávkovací smyčky (methanol)

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Postup

Připravte extrakt vzorku

1. Diferenciálně navažte maximálně 0,1 g instantní kávy nebo čaje (při diferenciálním vážení si zaznamenáte hmotnost vzorku naváženého na lodičce a hmotnost lodičky po vysypání vzorku do kádinky, z rozdílu zjistíte přesnou hmotnost vzorku), zalijte v kádince přibližně 70 ml horké deionizované vody a 5 min louhovat za občasného promíchání. Přefiltrujte a filtrát doplňte ve 100 ml odměrné baňce deionizovanou vodou po značku.
2. 1 ml extraktu pročistěte extrakcí na tuhé fázi (SPE). Předseparaci proveďte prosátím extraktu vzorku kávy nebo čaje přes sorpční kolonku (sorbent kolonky je chemicky vázaný oktadecylsilán). V prvním kroku připravte SPE kolonku na extrakci. Promyjte ji 2 ml methanolu a poté 2 ml deionizované vody (pozor, povrch sorbentu se mezi promýváními nesmí vysušit).
3. Následně proveďte předseparaci vzorku na kolonce: průtokem asi 1 ml/min přesejte zvolené množství vzorku (1 ml) přes kolonku.
4. Dále kolonku promyjte 2 ml deionizované vody a následně vysušte vakuem po dobu 10 minut.
5. V posledním kroku SPE proveďte eluci kofeinu z kolonky: kofein vymyjte z kolonky 1 ml acetonitrilu.
6. Výsledný roztok (extrakt) ve vialce doplňte do 1 ml acetonitrilem a poté analyzujte vysoce účinnou kapalinovou chromatografií.
7. Připravte srovnávací zásobní roztok kofeinu do deionizované vody (10 mg/ml).
8. Ze zásobního roztoku nejprve připravte roztok o koncentraci 1 mg/ml (do 25 ml odměrné baňky ředění směsí methanol:voda v poměru 50:50 (v:v)).
9. Z roztoku s $c = 1$ mg/ml připravte 5 kalibračních roztoků kofeinu v rozsahu koncentrací od 0,01 do 0,1 mg/ml (do 25 ml odměrných baněk, ředění směsí methanol:voda v poměru 50:50 (v:v)).

Analýza referenčních látek a vzorku

1. K určení mrtvého elučního času se použije roztok NaNO_2 připravený v methanolu (0,1 mg/ml).
2. Pro dávkování referenční látky a vzorků do dávkovací smyčky použijte mikrostríkačku, kterou je třeba před použitím důkladně propláchnout promývacím roztokem (methanol).
3. Za stejných podmínek postupně dávkujte roztok referenční látky, roztok NaNO_2 a roztok nápoje přečištěný na SPE. Každé měření je třeba zopakovat 3krát.
4. Pomocí připraveného srovnávacího roztoku kofeinu se analýzou zjistí příslušné eluční charakteristiky potřebné pro kvalitativní analýzu. Na chromatogramu z analýzy upraveného vzorku zjistíte přítomnost kofeinu.
5. Pro kvantitativní analýzu kofeinu metodou kalibrační křivky se metodou HPLC analyzuje sada připravených kalibračních roztoků.

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Nakládání s chemickými látkami

Chemikálie	Forma	H-věty	P-věty
Methanol (CH ₃ OH)	Kapalina	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P260, P280, P301 + P310, P311
Acetonitril (CH ₃ CN)	Kapalina	H225, H302 + H312 + H332, H319	P210, P280, P305 + P351 + P338, P403 + 235
NaNO ₂	Pevná	H272, H301, H319, H400	P210, P220, P264, P273, P301 + P310, P305 + P351 + P338

Zdroje rizik a vyhodnocení závažnosti rizika

Metanol je hořlavá kapalina. Je toxický při požití, při styku s kůží, při vdechování. Způsobuje poškození orgánů. Žáci dostávají mobilní fázi předem připravenou v zásobníku mobilní fáze. Pracují pod odborným dohledem vyučujícího a používají osobní ochranné prostředky. Přijatelné riziko.

Acetonitril je hořlavá kapalina. Je zdraví škodlivý při požití, styku s kůží a vdechování. Způsobuje vážné podráždění očí. Žáci pracují pod odborným dohledem vyučujícího. Pracují s malými objemy a při práci používají osobní ochranné prostředky. Přijatelné riziko.

Dusitan sodný je toxická látka při požití. Způsobuje vážné podráždění očí. Je toxický pro vodní organismy. Může přispět k rozvoji požáru, protože je oxidačním činidlem. Žáci nepřicházejí do kontaktu s tuhou látkou, dostávají připravený roztok NaNO₂ o koncentraci $c = 0,1$ mg/ml. Během práce v laboratoři se nepracuje s otevřeným ohněm. Přijatelné riziko.

Způsob nakládání s odpady

Zbytky roztoků vylijte do nádoby určené ke sběru nechlorovaného organického odpadu.

Opatření k omezení rizika

Vyhnete se přímé expozici, používejte ochranné prostředky. Nevystavujte se dlouhodobé nebo opakované expozici. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, okamžitě informujte vyučujícího. Tyto látky nebo jejich obaly musí být likvidovány jako nebezpečný odpad. Nejezte, nepijte, nekuřte v laboratoři. Po práci nebo při přerušení práce si umyjte ruce teplou vodou a mýdlem.

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Literatura

1. Purdešová, A. – Tarapčík, P. et al.: *Praktikum z analytickej chémie*. Bratislava: STU, 2016. ISBN 978-80-227-3555-1.

Pracovní list

Experimentální údaje

1. Příprava zásobního roztoku vzorku (diferenčně 0,1 g do 100 ml baňky)

	Hmotnost [g]
Lodička s návažkem	
Lodička po vysypání	
Hmotnost vzorky	

2. Kolik μl je třeba odpipetovat ze zásobního roztoku kofeinu o koncentraci 1 mg/ml pro přípravu 25 ml roztoků o koncentraci 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 mg/ml?

	0,01 mg/ml	0,03 mg/ml	0,05 mg/ml	0,07 mg/ml
Objem roztoku kofeinu s koncentrací 1 mg/ml [μl]				

3. Z analýzy standardů zaznamenejte eluční časy NaNO_2 a kofeinu.

	t_R (NaNO_2) [min]	t_R (kofein) [min]
1		
2		
3		

Výpočty

1. Do excelovské tabulky zaznamenejte hodnoty elučního času kofeinu, plochy a výšky pík naměřených pro standardní roztoky kofeinu.

roztok	0,01 mg/ml	0,03 mg/ml	0,05 mg/ml	0,07 mg/ml	0,01 mg/ml
Eluční čas [min]					
Plocha píku					
Výška píku					

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



2. Do excelovské tabulky zaznamenejte hodnoty elučního času kofeinu, plochy a výšky píků ve vzorku.

<i>Vzorek</i>	Eluční čas [min]	Plocha píku	Výška píku
1.			
2.			
3.			

3. Do kalibračního grafu vynesete závislost A (plocha píku) na c (koncentrace standardu). Vyhodnoťte jej metodou nejmenších čtverců a zapište rovnici kalibrační křivky a koeficient korelace.
4. Pomocí plochy píku kofeinu naměřeného ve vzorku odečtete koncentraci kofeinu.
5. Vypočítejte množství kofeinu v kávě nebo čaji a vyjádřete jeho obsah na 100 g.
6. Do kalibračního grafu vynesete závislost V (výška píku) na c (koncentrace standardu). Vyhodnoťte jej metodou nejmenších čtverců a zapište rovnici kalibrační křivky a koeficient korelace.
7. Pomocí výšky píku kofeinu naměřeného ve vzorku odečtete koncentraci kofeinu.
8. Vypočítejte množství kofeinu v kávě nebo čaji a vyjádřete jeho obsah na 100 g.

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Otázky

1. Vysvětlete, proč nemůžeme přímo analyzovat kávu nebo čaj, ale potřebujeme použít SPE k úpravě vzorku kávy nebo čaje.
2. Vysvětlete, jak funguje UV/VIS detektor. Proč můžeme ke stanovení kofeinu používat UV/VIS detektor.
3. Popište, jak změna koncentrace látky ve vzorku ovlivňuje eluční čas, výšku a plochu píků.
4. Jaký typ stacionární a mobilní fáze a používá při HPLC stanovení kofeinu.
5. Uveďte chyby a jejich zdroje při stanovení kofeinu v kávě nebo čaji. Navrhněte možná řešení.

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



6. Napište z jakých částí/modulů se skládá HPLC zařízení.

7. Definujte a popište kroky extrakce na tuhé fázi (SPE).

Závěr

Shrňte stručně cíl experimentu, hlavní výsledky a porovnejte je s očekávanými hodnotami.

Název projektu: Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Prohlášení o vyloučení odpovědnosti

Financováno Evropskou unií. Vyjádřené názory a postoje jsou názory a prohlášeními autora(ů) a nemusí nutně odrážet názory a stanoviska Evropské unie nebo Slovenské akademické asociace pro mezinárodní spolupráci, Národní agentury programu Erasmus+ pro vzdělávání a odbornou přípravu. Evropská unie ani organizace udělující grant za ně nepřebírají žádnou odpovědnost.