

Názov: Stanovenie kofeínu v čaji a káve metódou HPLC-UV

Návod na prácu

Zadanie:

1. Metódou HPLC-UV zistíte prítomnosť kofeínu vo vzorkách kávy alebo čaju na základe porovnania chromatografických elučných charakteristík zložiek vzorky a referenčnej látky.
2. Metódou kalibračnej krivky určíte koncentráciu kofeínu.

Teória

Kofeín je alkaloid zo semien kávovníka, avšak nachádza sa aj v iných rastlinách. Má povzbudzujúce účinky na centrálnu nervovú sústavu a používa sa ako súčasť mnohých povzbudzujúcich nápojov (napr. v kolových nápojoch). Odvar z pražených semien kávovníka – káva – je obľúbeným nápojom na celom svete, najmä vďaka obsahu kofeínu. Je to návyková látka.

Cieľom práce je stanovenie kofeínu v nápojoch. Kofeín sa zo vzorky extrahuje metódou extrakcie na tuhej fáze (SPE) a následná analýza sa uskutoční pomocou metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) na obrátených fázach s mobilnou fázou metanol:voda. Na detekciu kofeínu sa použije spektrofotometrický detektor pri vlnovej dĺžke 270 nm. Analýza sa vykoná pomocou systému HPLC, ktorý sa skladá z niekoľkých modulov:



Pomôcky: HPLC zariadenie, zariadenie na extrakciu na tuhej fáze, analytické váhy, navažovacia lodička, kadička (100 ml), odmerný valec, tyčinka, filtračný papier, filtračný lievnik, laboratórny stojan, odmerná banka (250 ml), odmerné banky (25 ml, 6 ks), Pasteurová pipeta, automatické pipety, vialka na zachytávanie extraktu, SPE kolónky (C18-oktadecyl), mikrostriekačka

Chemikálie: štandardný roztok kofeínu vo vode (98 %), chemikálie na prípravu mobilnej fázy a extrakciu (acetonitril, metanol), vzorka (čaj, instantná káva), roztok NaNO₂ na určenie mŕtveho elučného času ($c = 0,1$ mg/ml), deionizovaná voda, roztok na premývanie dávkovacej slučky (metanol)

Postup

Pripravte extrakt vzorky

1. Diferenciálne navážte maximálne 0,1 g instantnej kávy alebo čaju (pri diferenciálnom vážení si zaznamenáte hmotnosť vzorky naváženej na lodičke a hmotnosť lodičky po vysypaní vzorky do kadičky, z rozdielu zistíte presnú hmotnosť vzorky), zalejte v kadičke približne 70 ml horúcej deionizovanej vody a nechajte 5 min lúhovať za občasného premiešania. Prefiltrujte a filtrát doplňte v 100 ml odmernej banke deionizovanou vodou po značku.
2. 1 ml extraktu prečistite extrakciou na tuhej fáze (SPE). Predseparáciu uskutočnite presatím extraktu vzorky kávy alebo čaju cez sorpčnú kolónku (sorbet kolónky je chemicky viazaný oktadecylsilán). V prvom kroku pripravte SPE kolónku na extrakciu. Premyte ju 2 ml metanolu a potom 2 ml deionizovanej vody (pozor, povrch sorbentu sa medzi premývaniami nesmie vysušiť).
3. Následne uskutočnite predseparáciu vzorky na kolónke: prietokom asi 1 ml/min presajte zvolené množstvo vzorky (1 ml) cez kolónku.
4. Ďalej kolónku premyte 2 ml deionizovanej vody a následne vysušte vákuom po dobu 10 minút.
5. V poslednom kroku SPE uskutočnite elúciu kofeínu z kolónky: kofeín vymyte z kolónky 1 ml acetonitrilu.
6. Výsledný roztok (extrakt) vo vialke doplňte do 1 ml acetonitrilom a potom analyzujte vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.
7. Pripravte porovnávací zásobný roztok kofeínu do deionizovanej vody (10 mg/ml).
8. Zo zásobného roztoku najskôr pripravte roztok s koncentráciou 1 mg/ml (do 25 ml odmernej banky riedenie zmesou metanol:voda v pomere 50:50 (v:v)).
9. Z roztoku s $c = 1$ mg/ml pripravte 5 kalibračných roztokov kofeínu v rozsahu koncentrácií od 0,01 do 0,1 mg/ml (do 25 ml odmerných baniek, riedenie zmesou metanol:voda v pomere 50:50 (v:v)).

Analýza referenčných látok a vzorky

1. Na určenie mŕtveho elučného času sa použije roztok NaNO_2 pripravený v metanole (0,1 mg/ml).
2. Na dávkovanie referenčnej látky a vzoriek do dávkovacej slučky použite mikrostriekačku, ktorú je potrebné pred použitím dôkladne prepláchnuť premývacím roztokom (metanol).
3. Za rovnakých podmienok postupne dávkujte roztok referenčnej látky, roztok NaNO_2 a roztok nápoja prečistený na SPE. Každé meranie je potrebné zopakovať 3-krát.
4. Pomocou pripraveného porovnávacieho roztoku kofeínu sa analýzou zistia príslušné elučné charakteristiky potrebné na kvalitatívnu analýzu. Na chromatograme z analýzy upravenej vzorky zistíte prítomnosť kofeínu.
5. Pre kvantitatívnu analýzu kofeínu metódou kalibračnej krivky sa metódou HPLC analyzuje sada pripravených kalibračných roztokov.

Nakladanie s chemickými látkami

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

Zdroje rizík a vyhodnotenie závažnosti rizika

Metanol je horľavá kvapalina. Je toxický pri požití, pri styku s kožou, pri vdychovaní. Spôsobuje poškodenie orgánov. Žiaci dostávajú mobilnú fázu vopred pripravenú v zásobníku mobilnej fázy. Pracujú pod odborným dohľadom vyučujúceho a používajú osobné ochranné prostriedky. Prijateľné riziko.

Acetonitril je horľavá kvapalina. Je zdraviu škodlivý pri požití, styku s kožou a vdychovaní. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Žiaci pracujú pod odborným dohľadom vyučujúceho. Pracujú s malými objemami a pri práci používajú osobné ochranné prostriedky. Prijateľné riziko.

Dusitan sodný je toxická látka pri požití. Spôsobuje vážne podráždenie očí. Je toxický pre vodné organizmy. Môže prispieť k rozvoju požiaru, pretože je oxidačným činidlom. Žiaci neprichádzajú do kontaktu s tuhú látkou, dostávajú pripravený roztok NaNO₂ s koncentráciou $c = 0,1$ mg/ml. V priebehu práce v laboratóriu sa nepracuje s otvoreným ohňom. Prijateľné riziko.

Spôsob nakladania s odpadmi

Zvyšky roztokov vylejte do nádoby určenej na zber nechlórovaného organického odpadu.

Opatrenia k obmedzeniu rizika

Vyhňte sa priamej expozícii, používajte ochranné prostriedky. Nevystavujte sa dlhodobej alebo opakovanej expozícii. V prípade nehody alebo ak sa necítite dobre, okamžite informujte vyučujúceho. Tieto látky alebo ich obaly sa musia likvidovať ako nebezpečný odpad. Nejedzte, nepite, nefajčite v laboratóriu. Po práci alebo pri prerušení práce si umyte ruky teplou vodou a mydlom.

Pracovný list

Experimentálne údaje

1. Príprava zásobného roztoku vzorky (diferenčne 0,1 g do 100 ml banky)

	Hmotnosť [g]
Lodička s návažkom	
Lodička po vysypaní	
Hmotnosť vzorky	

2. Koľko μl je potrebné odpipetovať zo zásobného roztoku kofeínu s koncentráciou 1 mg/ml na prípravu 25 ml roztokov s koncentráciou 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 kofeínu s koncentráciou 1 mg/ml [μl]				

3. Z analýzy štandardov zaznamenajte elučné časy NaNO_2 a kofeínu.

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

Výpočty

1. Do excelovskej tabuľky zaznamenajte hodnoty elučného času kofeínu, plochy a výšky pík nameraných pre štandardné roztoky kofeínu.

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

2. Do excelovskej tabuľky zaznamenajte hodnoty elučného času kofeínu, plochy a výšky píkovo vo vzorke.

Vzorka	Elučný čas [min]	Plocha píku	Výška píku
1.			
2.			
3.			

3. Do kalibračného grafu vyneste závislosť A (plocha píku) od c (koncentrácie štandardu). Vyhodnoťte ho metódou najmenších štvorcov a zapíšte rovnicu kalibračnej krivky a koeficient korelácie.
4. Pomocou plochy píku kofeínu nameraného vo vzorke odčítajte koncentráciu kofeínu.
5. Vypočítajte množstvo kofeínu v káve alebo čaji a vyjadrite jeho obsah na 100 g.
6. Do kalibračného grafu vyneste závislosť A (výška píku) od c (koncentrácie štandardu). Vyhodnoťte ho metódou najmenších štvorcov a zapíšte rovnicu kalibračnej krivky a koeficient korelácie.
7. Pomocou výšky píku kofeínu nameraného vo vzorke odčítajte koncentráciu kofeínu.
8. Vypočítajte množstvo kofeínu v káve alebo čaji a vyjadrite jeho obsah na 100 g.

Názov projektu: Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Otázky

1. Vysvetlite, prečo nemôžeme priamo analyzovať kávu alebo čaj ale potrebujeme použiť SPE na úpravu vzorky kávy alebo čaju.
2. Vysvetlite, ako funguje UV/VIS detektor. Prečo môžeme na stanovenie kofeínu používať UV/VIS detektor.
3. Opíšte, ako zmena koncentrácie zlúčenín vo vzorke ovplyvňuje elučný čas, výšku a plochu pík.
4. Aký typ stacionárnej a mobilnej fázy a používa pri HPLC stanovení kofeínu.
5. Uveďte chyby a ich zdroje pri stanovení kofeínu v káve alebo čaji. Navrhnite možné riešenia.

Názov projektu: Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



6. Napíšte z akých častí/modulov sa skladá HPLC zariadenie.

7. Zdefinujte a popíšte kroky extrakcie na tuhej fáze (SPE).

Záver

Zhrňte stručne cieľ práce a experimentálne výsledky. Zhodnoťte presnosť merania, identifikujte možné chyby a navrhните spôsoby ich eliminácie.

Názov projektu: Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách
Akronym: ChemIQSoc
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Vyhlásenie o vylúčení zodpovednosti

Financované Európskou úniou. Vyjadrené názory a postoje sú názormi a vyhláseniami autora(-ov) a nemusia nevyhnutne odrážať názory a stanoviská Európskej únie alebo Slovenskej akademickej asociácie pre medzinárodnú spoluprácu, Národnej agentúry programu Erasmus+ pre vzdelávanie a odbornú prípravu. Európska únia ani organizácia udeľujúca grant za ne nepreberajú žiadnu zodpovednosť.