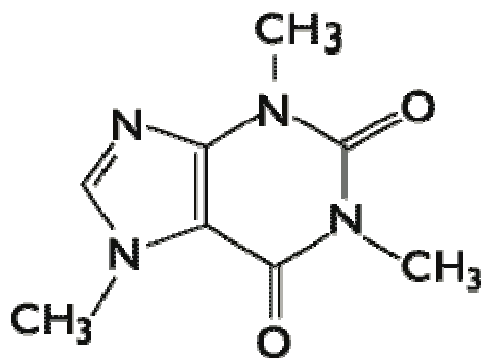


# Analýza kofeinu v kávě pomocí kapalinové chromatografie

Kofein (obr.1) se jako přírodní alkaloid vyskytuje v mnoha rostlinách (např. fazolích, kakaových bobech, černém čaji apod.) avšak nejvíce je spojován s kávovými boby a i s kávou.

Kofein je bílá krystalická látka patřící do skupiny, methylovaných derivátů xantinu. Do této skupiny patří také teobromin a teofylin. V lidském těle působí kofein převážně na centrální nervovou soustavu a potlačuje únavu.

Obrázek 1: Struktura kofeinu



Jedna z technik umožňující analýzu kofeinu je kapalinová chromatografie s reverzní stacionární fází. Kapalinová chromatografie je separační metoda, využívající dělení směsi látek mezi 2 fáze (stacionární a mobilní). Molekula analytu (A) je opakovaně transportována do stacionární fáze a zpět do mobilní. Děj je možné popsat distribuční (rozdělovací konstantou) (rovnice 1). Čím větší jsou rozdíly v hodnotě  $K_{D(A)}$  jednotlivých separovaných látek, tím vyšší je selektivita chromatografické separace.

Rovnice 1: Distribuční konstanta

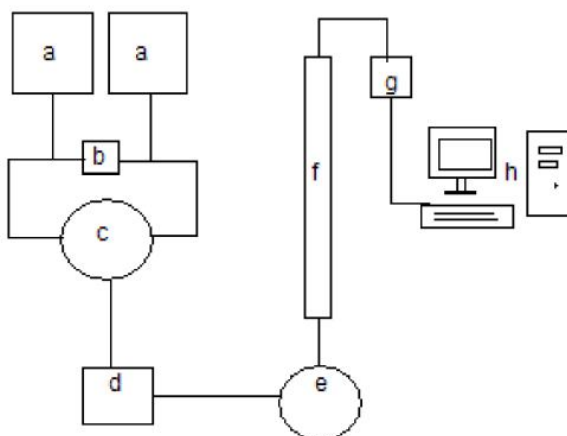
$$K_{D(A)} = \frac{[A]_S}{[A]_M} = \frac{(n_A)_S V_M}{(n_A)_M V_S}$$

$K_{D(A)}$  – distribuční konstanta,  $[A]_S$  a  $[A]_M$  – rovnovážné koncentrace složky A ve stacionární a mobilní fázi,  $(n_A)_S$  a  $(n_A)_M$  – látková množství složky A ve stacionární a mobilní fázi,  
 $V_S$  a  $V_M$  – objemy stacionární a mobilní fáze v chromatografickém systému.

Základy kapalinové chromatografie položil počátkem minulého století ruský botanik Cvět, kterému se podařilo separovat směs listových barviv. V tuto dobu ovšem nebyla tato metoda dostatečně doceněna. Teprve až koncem šedesátých let došlo k rychlému vývoji moderní vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Mezi přední osobnosti, kterým vděčíme za současnou podobu chromatografie patří Horvath, Kirkland, Huber, Martin a Synge. V roce 1952 získali Martin a Synge Nobelovu cenu za objasnění pochodů v koloně a jejich souvislosti s účinností chromatografického procesu. Při zavedení náplní kolon s chemicky vázanými fázemi došlo k výraznému zlepšení separace s dobrou reprodukovatelností.

Na obrázku 2 je zobrazeno schéma kapalinového chromatografu: (a) zásobníky mobilní fáze, (b) programování gradientu, (c) směšovač mobilní fáze, (d) vysokotlaké čerpadlo, (e) dávkovací zařízení, (f) chromatografická kolona, (g) detektor, (h) počítač. V případě potřeby, můžou být připojeny další zařízení: odplyňovač mobilní fáze, předkolumna, frakční kolektor.

Obrázek 2: Schéma kapalinového chromatografu



Separace v chromatografické koloně probíhá různými mechanismy. Základní mechanismy jsou adsorpce, rozdělování, chemisorpce a síťový efekt.

Kolony s reverzní fází separují na základě rozdělování a jsou v dnešní době nejpoužívanějším typem stacionární fáze pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Lze je s úspěchem aplikovat přibližně na 80- 90% separačních úloh. Jako mobilní fáze je použito polární rozpouštědlo, nejčastěji voda s příměsí organického rozpouštědla (methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, dioxan). Stacionární fáze je tvořena chemicky vázanými nepolárními skupinami na silikagelu jako nosiči. Ve výjimečných případech se používá uhlík nebo organické polymery.

## Chromatografické podmínky:

Kolona: 4x250 mm; 5  $\mu$ m; Tessek Separon SGX C18

Mobilní fáze: CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (70:29:1)

Detekce: UV absorpce při 280 nm

Nástřik: dávkování 100  $\mu$ l dávkovací stříkačkou (Hamilton) do 20  $\mu$ l dávkovací smyčky (přepřínování smyčky; technika „full loop“)

Průtoková rychlost: 0,35 ml/min.

## Pracovní postup:

- 1) Připravíme si 100 ml MF o poměru složek CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 70:29:1.
- 2) Připravíme si výchozí vzorek kávy, ze kterého odebereme 1 ml, který zředíme 10x do 10 ml odměrné baňky mobilní fází a před vlastní analýzou zfiltrujeme přes diskový mikrofiltr (0,22  $\mu$ m).
- 3) Pro kvantifikaci si připravíme roztok kofeinu rozpuštěním 1 mg standardní látky v 10 ml mobilní fáze (roztok o koncentraci 100mg/l).
- 4) Ředěním roztoku připraveného v bodě 3) připravíme kalibrační řadu o koncentraci 1, 5, 10, 50, 100 mg/l
- 5) Proměříme vzorek kávy a kalibrační řadu.
- 6) Navážíme si 1 mg standardní látky teofylinu rozpustíme ji v 1 ml MF. Takto připravený standart zředíme 100x na požadovanou koncentraci 10 mg/l.
- 7) 0,5 ml vzorku kávy smícháme s 0,5 ml standardního roztoku látky teofylinu (roztok zfiltrujeme přes diskový mikrofiltr). Vzniklou směs analyzujeme.

## Vyhodnocení:

Pík kofeinu ve vzorku se zintegruje a jeho koncentrace se stanoví s využitím proměřené kalibrační křivky.

Do protokolu uveďte množství kofeinu ve vzorku kávy v mg/l.

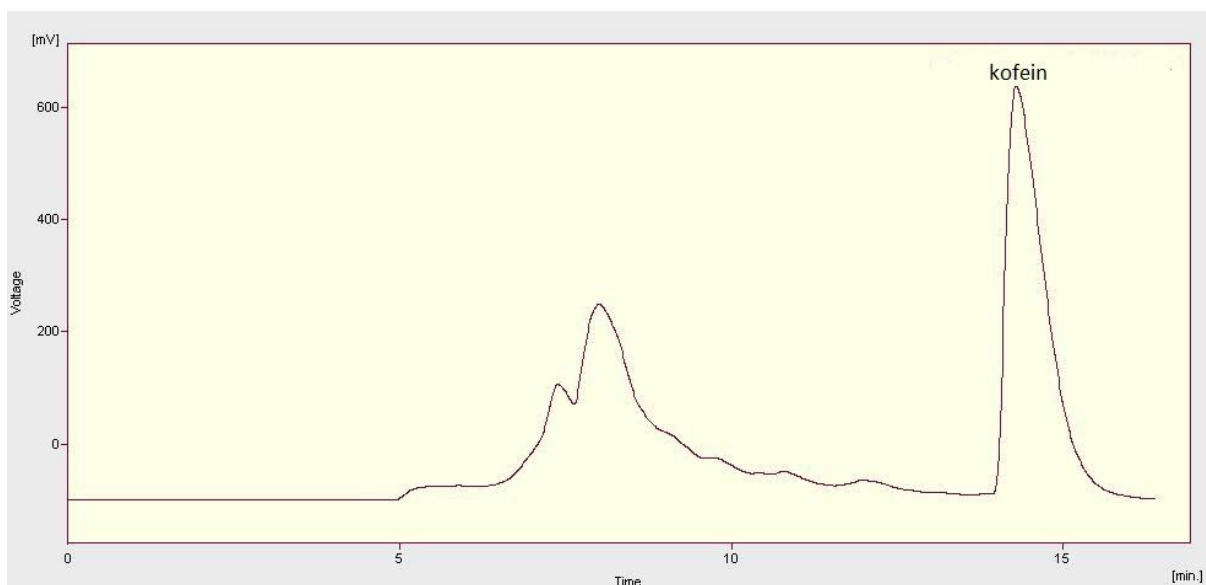
## Úkoly:

- 1) Stanovte množství kofeinu v kávě.
- 2) Jak se nazývá metoda popsaná v bodě 7)
- 3) Identifikujte píky teofylinu v chromatografu.

**Použitá literatura:**

- 1) <http://www.biotox.cz/chemicals/alkaloid/kofein.htm>
- 2) Z. Holzbecher, J. Churáček: Analytická chemie, SNTL, Praha 1987
- 3) K. H. Chou, L. N. Bell, *J. Food Sci.* **2007**, 72

Příloha 1: Ukázka chromatogramu vzorku kávy



Příloha 2: Kalibrační závislost standardů kofeinu

