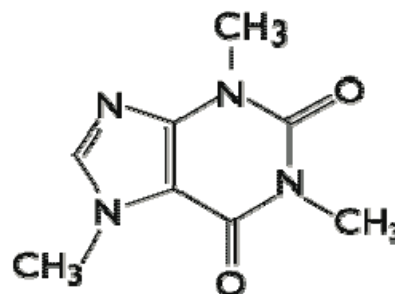
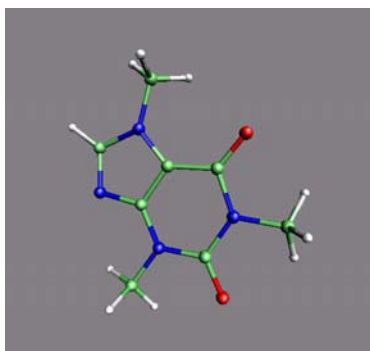


Bestemmelse af koffein i cola



1,3,7-trimethylxanthine

Koffein i læskedrikke

Læs følgende links, hvor der blandt andet står nogle informationer om koffein og regler for hvor meget koffein, der må være i en læskedrik:

http://www.caffeinedependence.org/caffeine_dependence.html

<http://en.wikipedia.org/wiki/Caffeine>

http://www.gomotion.dk/artikler.asp?p_id=111&a_id=40&mode=detail&title=art

Sikkerhed

- Brug handsker under hele eksperimentet
- Koffein er dødeligt i doser omkring 5-10 gram! Vi når langt fra så højt op.
- Dichlormethan er carcinogent og skal befinde sig i stinkskalet under hele eksperimentet eller i lukkede beholderen med prop på.
- Acetone skal befinde sig i stinkskalet under hele eksperimentet eller i lukkede beholderen med prop på

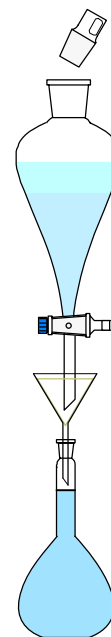
Ekstraktion

For at adskille koffeinen fra andre stoffer i læskedrikken, benytter vi metoden ekstraktion. Dette gøres ved at udnytte koffeins forskellige opløselighed i vand og et organisk opløsningsmiddel. Princippet er at vælge et organisk opløsningsmiddel, som ikke er blandbart med vand, og hvori koffein har en høj opløselighed. Det kunne f.eks. være dichlormethan.

Metoden går kort fortalt ud på, at trække så meget koffein som muligt ud af læskedrikken. Læskedrikken gøres først basisk for at nedsætte koffeins vandopløselighed, så den bliver mere opløselig i dichlormethanen.

Læskedrikken hældes nu sammen med det organiske opløsningsmiddel i en skilletragt, og de to faser blandes forsigtigt. Det optimale vil være at blande de to lag grundigt ved at ryste de to opløsninger grundigt sammen, men herved opstår et stort emulgerende lag mellem de to faser, og det vil vi gerne undgå.

Når de to faser er blevet adskilt efter at have stået nogle minutter, tappes den organiske fase ud af tragtens (den nederste fase, da dichlormethan har en densitet på 1,23g/mL). Ved at gentage processen flere gange (og hver gang opsamle den organiske fase) øges udbyttet.



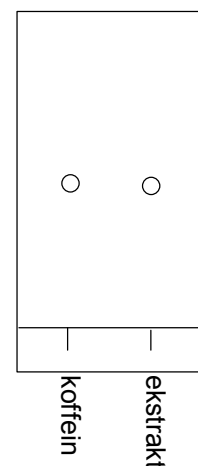
Tyndtlagskromatografi



Kromatografiske metoder benyttes til at adskille og identificere de forskellige stoffer i en kompleks blanding. Her anvendes ofte kieselgel. Ca. 1 cm fra pladens underkant placeres en lille smule (en plet med en diameter på nogle få millimeter) af prøven, som man forinden har opløst i en væske. Desuden placeres en plet af en opløsning af noget rent stof på pladen. Så kan man sammenligne pletternes placering efter kromatograferingen med henblik på en identificering af stofferne i prøven. Når opløsningsmidlet er fordampet, og pletterne er tørre, kan selve kromatograferingen startes.

Pladen placeres i et udviklingskar (bægerglas eller lignende), hvor der i bunden er lidt af den mobile fase, som f.eks. kan være acetone. Det er vigtigt, at acetonen ikke dækker pletterne. Et låg lægges over karret, og den mobile fase vil begynde at vandre op ad pladen. Når det når pletterne, vil de delvist blive trukket med. Hvis to stoffer vandrer ca. lige langt, har man sandsynliggjort, at det er det samme stof, men man kan ikke sige noget med sikkerhed.

Vi kan se på pladen til højre, at der sandsynligvis er koffein i den analyserede prøve.

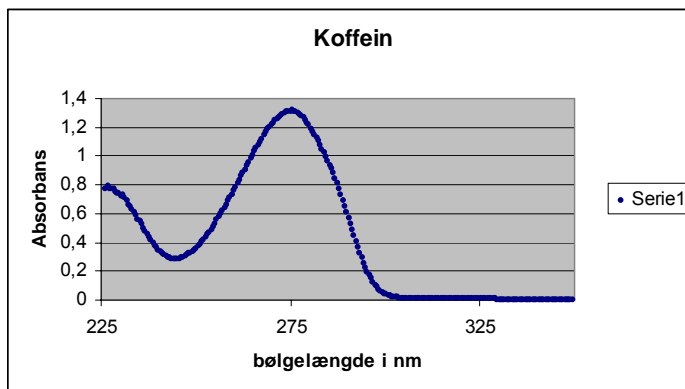


UV-spektrum.

En endnu mere præcis metode vil være at optage et UV-spektrum af det ekstraherede koffein og sammenligne med spektret af ren koffein. Herudfra kan man også bestemme hvor meget koffein, der er i læskedrikken.

Man bruger et spektrofotometer, som måler hvor meget lys koffein absorberer. Molekylet ikke er farvet, men absorberer UV-lys, som vi ikke

kan se. Spektrofotometret kan tegne et spektrum, som viser hvor meget lys en opløsning af koffein absorberer ved forskellige bølgelængder. På figuren kan man se, at koffein har absorptionsmaksimum ved ca 275 nm. Hvert stof har sit eget spektrum, det er ikke så entydigt som et fingeraftryk, men det kan bruges til at sandsynliggøre, at det er det rigtige stof, man har i sit ekstrakt – hvis spektret for ekstraktet ligner et spektrum af en standard, er det sikkert koffein. Ved hjælp af Lambert-Beers lov kan man ud fra en standardkurve beregne, hvor meget koffein der er i ekstraktet og dermed i læskedrikken.



Lambert-beers lov $A = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$

Hvor A er absorbansen, ϵ_{λ} er den molare ekstinktionskoefficient (afhænger af bølgelængden, λ), c er stofmængdekonzentrationen og l er kuvettebredden. Det ses, at for fastholdt kuvettebredde og fastholdt bølgelængde er der en lineær sammenhæng mellem koncentration og absorbans. Man kan derfor omformulere Lambert-Beers lov til en simple version:

$$A = k \cdot c$$

Hvor k er hældningskoefficienten for den rette linie gennem punkterne (konc, abs). Først måles absorbansen for en række standard-opløsninger med kendte koncentrationer ved den bølgelængde, hvor koffein absorberer maksimalt. Ud fra disse tal laves en standardkurve, som er en grafisk afbildning af absorbans som funktion af koncentration. Hvis punkterne viser en lineær sammenhæng er Lambert-Beers lov eftervist. Forskriften for den lineære sammenhæng udregnes. Absorbansen for en opløsning med ukendt koncentration af koffein måles og koncentrationen af koffein udregnes ud fra den fundne forskift.

Udførelse

Ekstraktion

Kemikalier:

Dichlormethan CH_2Cl_2

Natriumcarbonat Na_2CO_3

pH-indikatorpapir

Apparatur:

Skilletragt – 25 mL eller 50 mL

Stativ med ring til skilletragt

Reagensglas

Pipette 5 mL

Bægerglas 25 mL

Måleglas 10 mL

Målekolbe 50 mL

1. Først skal læskedrikken afbruses. Hæld ca. 10 mL læskedrik i et reagensglas. Ryst reagensglas med indhold godt indtil der ikke er mere brus i læskedrikken, brug evt. ultralydsbad.
2. Overfør læskedrikken til bægerglasset og tilsæt $\frac{1}{2}$ tsk natriumcarbonat til læskedrikken. Tjek at væsken er svagt basisk (pH-indikatorpapiret vil vise grøn-blå farve), hvis ikke, tilsættes lidt mere natriumcarbonat.
3. Afmål 5,0 mL af den nu basiske læskedrik med pipetten og overfør det til skilletragten. Tilsæt forsigtigt 10 mL dichlormethan. Vend forsigtigt skilletragten frem og tilbage nogle gange, husk at lufte ud undervejs.
4. Sæt skilletragten i holderen og lad de to faser adskille. Tag proppen af og tap nederste fase ud i en 50 mL målekolbe. Undgå at få noget af vandfasen med!
5. Gentag udrykning og aftapning med endnu 2 gange 10 mL dichlormethan. Saml de organiske faser i samme 50 mL målekolbe. Fyld til sidst op til strengen med dichlormethan.

Notater

TLC

Kemikalier:

Acetone C_3H_6O

Ekstraktet fra før

Koffein-opløsning $C_8H_{10}N_4O_2$ (30 mg/L)

Apparatur:

Tilspidsede kapillarrør

100 mL bægerglas (høj form) med låg

TLC-plade behandlet med fluorescerende stof (Kiselgel)

UV-lampe

1. Tegn forsigtigt en blyantsstreg på TLC-pladen ca. 1 cm fra bunden.
2. Sug lidt af koffeinopløsningen op i et kapillærrør og afsæt en lille plet lige over strengen i den ene side på TLC pladen, se skitse i teori afsnittet. Lad pletten tørre let og sæt så endnu en plet oveni. Gentag dette til du har afsat 5-10 portioner oveni hinanden.
3. Sug lidt af dit ekstrakt op i et andet kapillærrør og afsæt en lille plet lige over strengen i den anden side på TLC pladen, se skitse i teori afsnittet. Lad pletten tørre let og sæt så endnu en plet oveni. Gentag dette til du har afsat 5-10 portioner oveni hinanden.
4. Kig på pladen under UV-lampen for at se, at der er to fine tydelige pletter.
5. Hæld ca $\frac{1}{2}$ cm acetone i bægerglasset og sæt din TLC-plade ned i væsken.
6. Lad pladen stå indtil væsken er løbet næsten helt op, tag pladen op og lad den tørre.
7. Når pladen er tør kigger du på den under UV-lampen. Er der grund til at tro, at der er koffein i dit ekstrakt og dermed din læskedrik?

Notater

UV-spektrum af ekstraktet.

Kemikalier:

Dichlormethan

Ekstraktet fra før

Koffein-opløsning $C_8H_{10}N_4O_2$ (30 mg/L)

Apparatur:

Spektrofotometer

Kuvetter af quartz

Målepipette 10 mL, 5 stk

Målekolber 10 mL, 5 stk

Målekolbe 1 L

1. Først skal spektrofotometret nulstilles på det rene opløsningsmiddel, nemlig dichlormethan. Hæld dichlormethan i kuvetten og kød en basislinie fra 225 nm til 350 nm
2. Kød nu et spektrum på den rene koffeinopløsning (30 mg/L). Få spektrofotometret til at markere toppunkterne og overfør spektret til computeren eller udskriv spektret.
3. Kød nu et spektrum på dit ekstrakt. Få spektrofotometret til at markere toppunkterne og overfør spektret til computeren eller udskriv spektret. Er der grund til at tro dit ekstrakt (og dermed din læskedrik) indeholder koffein?
4. Lav en fortyndingsrække ud fra koffeinstandard-opløsningen. Udtag de i tabellen viste volumener af standard-opløsningen, overfør til 10 mL målekolbe og fyld op med dichlormethan. Mål absorbansen for alle fortyndinger ved den bølgelængde som koffein absorberer mest ved. Mål også absorbansen for koffein-ekstraktet, hvis du ikke fik noteret værdien under punkt 3).

mL standard	2	4	6	8	10	Ekstrakt læskedrik
Koncentration i mg/L	6	12	18	24	30	
Absorbans						

5. Afbild den målte absorbans som funktion af koncentrationen af koffein (mg/L). Opfylder sammenhængen Lambert-Beers lov? Find den matematiske forskrift og beregn her ud fra indholdet af koffein i mg/L i ekstraktet.
6. Omregn ud fra fortyndingsfaktoren (5 mL læskedrik svarer til 50 mL ekstrakt) indholdet af koffein i mg/L i læskedrikken.
7. Hvordan stemmer det bestemte indhold overens med grænseværdierne for hvor meget en læskedrik må indeholde?

Notater

Note til ekstraktionen

Ved ekstraktionen vil koffeinmolekylerne flytte sig fra vandfasen (colaen) til dichlormethanfasen, idet opløseligheden af koffein er større i dichlormethan end i vand. Der vil indstille sig følgende ligevægt:



Fordelingskonstanten for denne ligevægt er :

$$K_f = \frac{c(\text{koffein(dichlormethan)})}{c(\text{koffein(aq)})}$$

Kender man koncentrationen af koffein i hhv dichlormethan og vand kan K_f beregnes. Men man kan også beregne K_f ud fra opløseligheden af koffein i de to opløsningsmidler. Ifølge ref.1 er opløseligheden af koffein i vand 22 mg/mL ved 25 °C og i dichlormethan 140 mg/mL. Indsættes disse to tal beregnes K_f til 6,4.

Vi kan ud fra K_f beregne hvor mange procent af koffeinen fra colaen, der vil være tilbage i vandfasen efter de 3 ekstraktioner.

Ved første ekstraktion er beregningen følgende:

Den oprindelige stofmængde af koffein i de 5 mL cola kaldes $n(\text{cola})$. Efter ekstraktionen vil en del af koffeinen befinde sig i de 10 mL dichlormethan, denne stofmængde kaldes $n(\text{CH}_2\text{Cl}_2)$. I vandfasen vil der være $n(\text{cola}) - n(\text{dichlormethan})$ til rest. Indsætter vi dette i K_f fås :

$$K_f = \frac{n(\text{dichlormethan})/10\text{mL}}{(n(\text{cola}) - n(\text{dichlormethan}))/5\text{mL}} = 6,4$$

Kalder vi den resterende stofmængde af koffein i vandfasen $n(\text{cola}) - n(\text{dichlormethan})$ for $n(\text{rest})$, kan stofmængden af koffein i dichlormethanfasen skrives som $n(\text{cola}) - n(\text{rest})$ og K_f kan omskrives til :

$$K_f = \frac{n(\text{cola}) - n(\text{rest})}{n(\text{rest})} = 12,8$$

Brøken $n(\text{rest})/n(\text{cola})$ angiver den brøkdel af koffeinen, som ikke er blevet ekstraheret over i dichlormethanen. For at gøre denne brøkdel så lille som muligt laver vi flere ekstraktioner, idet det vil være samme brøkdel der ekstraheres hver gang. Vi får på denne måde ekstraheret mere koffein fra colaen.

Brøkdelen $n(\text{rest})/n(\text{cola})$ kan beregnes ved at omskrive på K_f :

$$\frac{n(\text{rest})}{n(\text{cola}) - n(\text{rest})} = 0,07813 \Rightarrow \frac{n(\text{rest})/n(\text{cola})}{1 - n(\text{rest})/n(\text{cola})} = 0,07813 \Rightarrow \frac{x}{1 - x} = 0,07813$$

Hvor x svarer til brøken $n(\text{rest})/n(\text{cola})$. Løses den lille ligning for x fås at x , altså brøken $n(\text{rest})/n(\text{cola})$ er 0,072. Altså er der ca. 7,2 % tilbage ved hver ekstraktion. Udføres 3 ens ekstraktioner med de givne mængder tilbageholdes således:

$$0,072^3 = 0,00037 \approx 0,04 \%$$

Vi kan derfor tillades os at regne med at vi ekstraherer alt koffein fra colaen ved den givne metode.

Ref1:

http://www.pharmainfo.net/exclusive/technical/extraction_of_caffeine_from_tea_leaves/