

Ramanova spektroskopija kofeina

Bajan, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:958243>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Ivona Bajan

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Ramanova spektroskopija kofeina

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: Prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Zagreb, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

5. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....	3
2.1. Ramanova spektroskopija	3
2.1.1. Teorijska osnovica	3
2.1.2. Ramanov spektrometar.....	9
2.2. Kofein	12
2.3. Ramanov spektar kofeina	14
2.4. Određivanje kofeina u energetskim pićima.....	18
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	21

§ Sažetak

Ramanova spektroskopija analitička je metoda koja se koristi za kvantitativnu i kvalitativnu analizu uzoraka, a temelji se na vibracijskim prijelazima molekula uslijed interakcije molekula s elektromagnetskim zračenjem u infracrvenom i vidljivom dijelu spektra.

Kofein (1,3,5-trimetilksantin) alkaloidni je derivat ksantina koji se nalazi u mnogim biljkama i njihovim sjemenkama te u mnogim farmaceutskim proizvodima i komercijalno dostupnim proizvodima poput energetskih pića, kave, čaja, itd. U prirodi se kofein javlja u tri pseudopolimorfna oblika: α -anhidratni oblik, β -anhidratni oblik i monohidratni. Svaki oblik ima karakterističan Ramanov spektar, na temelju kojih se pojedini polimorfi mogu razlikovati.

Ramanova spektroskopija s Fourierovim transformacijama uz ekstrakciju na čvrstoj fazi: SP-FT Ramanova spektroskopija (engl. *solid-phase Fourier transform Raman spectroscopy*) je razvijena kao metoda za kvantitativno određivanje kofeina u različitim energetskim pićima. Pri tome je kao referentna metoda korištena tekućinska kromatografija s detekcijom u UV području (engl. *liquid chromatography-ultraviolet*, LC-UV). Opaženo je zadovoljavajuće slaganje rezultata FT-Ramanove spektroskopije s rezultatima tekućinske kromatografije.

Za razliku od metoda koje su u industriji uobičajene za kvantitativnu analizu sirovina i gotovih proizvoda, SP-FT Ramanova spektroskopija je puno brža i ekološki prihvatljivija alternativa jer zahtijeva značajno manje reagensa i otapala, čime se smanjuje količina otpada.

§ 1. UVOD

Ramanova spektroskopija analitička je metoda koja se temelji na efektu Ramanovog raspršenja. Prilikom interakcije molekule i elektromagnetskog zračenja može doći do neelastičnog raspršenja zračenja (Ramanovo raspršenje) pri čemu izlazni foton ima manju ili veću energiju od energije upadnog fotona. Interakcija elektromagnetskog zračenja u infracrvenom i vidljivom dijelu spektra s molekulom uzorkuje vibracijske prijelaze molekula. Da bi vibracija bila vidljiva u Ramanovom spektru, mora doći do promjene polarizabilnosti molekule.

Ramanov spektar karakterističan je za svaku molekulu jer se vibracijske vrpce mogu pripisati određenim funkcionalnim skupinama i strukturnim dijelovima molekule. Intenziteti Ramanovih vrpce ovise o mnogo različitih faktora, između ostalog i o koncentraciji analiziranog uzorka. Zbog spomenutih svojstava Ramanova se spektroskopija može koristiti i za kvalitativno i za kvantitativno određivanje sastava uzorka te nalazi široku primjenu. Ramanova spektroskopija je brza i ne zahtijeva korištenje velike količine otapala zbog čega je i ekološki prihvatljivija od većine metoda.

Kofein je alkaloid s ksantinskom bazom koji se u prirodi nalazi u mnogim biljkama i sjemenkama biljki. Djeluje kao stimulans centralnog živčanog sustava i mišićnog korteksa te povećava koncentraciju i osjećaj budnosti pa se zbog toga jako često koristi u napitcima u svakodnevnoj upotrebi ili kao dodatak nekim farmaceutskim proizvodima. Može se naći u tri pseudopolimorfna oblika: dva anhidratna i jedan hidratni oblik. Ramanovi spektri anhidratnih oblika razlikuju se od Ramanovog spektra monohidratnog oblika po nekoliko prepoznatljivih vibracijskih vrpce.

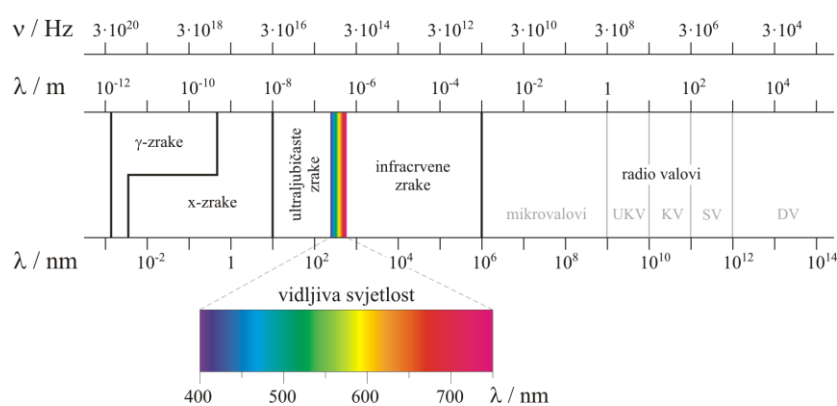
Ramanova spektroskopija primjenjena je za strukturnu analizu anhidratnog i monohidratnog oblika kofeina te za kvantitativnu analizu kofeina u različitim energetske pićima.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Ramanova spektroskopija

2.1.1. Teorijska osnovica

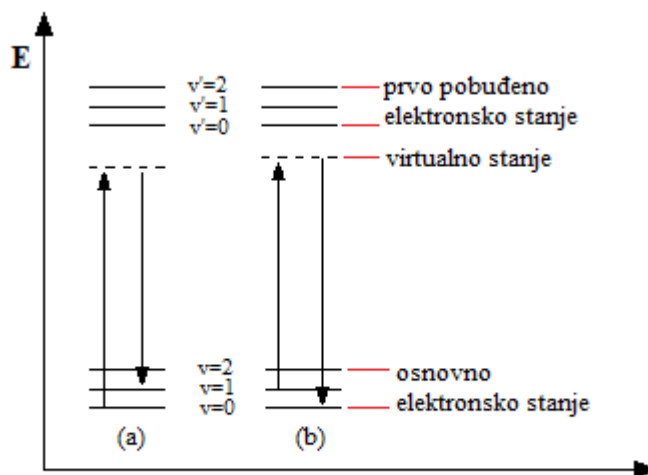
Elektromagnetsko zračenje može se opisati kao val koji ima definiranu valnu duljinu, frekvenciju, brzinu i amplitudu. Ono se pojavljuje u više različitih oblika (toplinsko zračenje, mikrovalno zračenje, svjetlost, rentgenske zrake), koji se međusobno razlikuju prema valnoj duljini, tj. frekvenciji. Elektromagnetski spektar (slika 2.1) proteže se u rangu valnih duljina od 10^{-12} m do 10^4 m.



Slika 2.1. Elektromagnetski spektar zračenja¹

Ukoliko se uzorak ozrači monokromatskim elektromagnetskim zračenjem, može doći do sljedećih pojava: apsorpcije, fluorescencije, Rayleighova raspršenja ili Ramanova raspršenja. Jedan dio ulaznog zračenja raspršuje se elastično, tj. frekvencija ulaznog zračenja jednaka je frekvenciji izlaznog te govorimo o Rayleighovom raspršenju. Drugi dio zračenja se raspršuje neelastično i tada se radi o Ramanovom raspršenju. Ramanova spektroskopija temelji se na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja. Ramanovo raspršenje mnogo je manje vjerojatnosti od Rayleighovog raspršenja, tj. u prosjeku će se samo 1 od 10^6 fotona neelastično raspršiti pri interakciji fotona s molekulom. Prilikom Ramanovog raspršenja frekvencija izlaznog zračenja može biti veća ili manja od frekvencije ulaznog zračenja. Ramanove vrpce, koje su posljedica raspršenja elektromagnetskog zračenja kada je frekvencija izlaznog zračenja manja nego frekvencija upadnog zračenja, nazivaju se Stokesove vrpce. Ramanove vrpce koje

su posljedica obrnutog efekta kada je frekvencija izlaznog zračenja veća nego frekvencija upadnog zračenja nazivaju se anti-Stokesove vrpce (slika 2.2).



Slika 2.2. Prikaz Stokesovih prijelaza (a) i anti-Stokesovih prijelaza (b) (v su vibracijski kvantni brojevi vibracijskih stanja u osnovnom stanju, a v' vibracijski kvantni brojevi vibracijskih stanja u pobuđenom stanju).²

Molekula pri interakciji s monokromatskim elektromagnetskim zračenjem prelazi u pobuđeno stanje. Na slici 2.2.a je prikazana molekula u osnovnom vibracijskom stanju $v = 0$ prije interakcije s elektromagnetskim zračenjem. Pri interakciji sa zračenjem molekula prelazi u virtualno stanje, jer energija pobude nije dovoljna da bi molekula prešla u prvo pobuđeno elektronsko stanje. Molekula se zatim vraća u pobuđeno vibracijsko stanje $v = 1$. Energija izlaznog zračenja je manja za iznos razlike energije osnovnog vibracijskog stanja i energije pobuđenog vibracijskog stanja te se radi o Stokesovom prijelazu. Na slici 2.2.b je prikazan slučaj kada je molekula prije interakcije s elektromagnetskim zračenjem u pobuđenom vibracijskom stanju. Nakon interakcije s elektromagnetskim zračenjem molekula također prelazi u virtualno stanje jer energija pobude nije dovoljna za prijelaz u prvo pobuđeno elektronsko stanje. Nakon interakcije s elektromagnetskim zračenjem molekula se vraća u osnovno vibracijsko stanje $v = 0$. Energija izlaznog fotona u ovom slučaju je veća nego energija ulaznog zračenja za iznos razlike energije osnovnog vibracijskog stanja i energije pobuđenog vibracijskog stanja te se radi o anti-Stokesovom prijelazu.

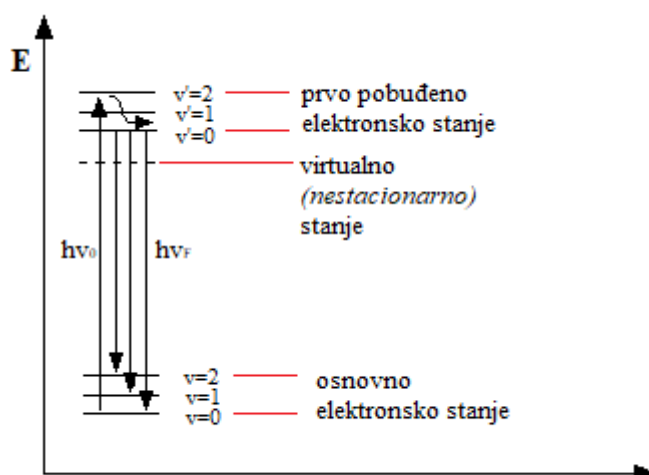
Prema Boltzmannovom zakonu (2.1) vjerojatnost da se molekula nalazi u određenom kvantnom stanju pada s porastom energije tog stanja pa iz toga možemo zaključiti da je

vjerojatnost da se molekula nalazi u osnovnom vibracijskom stanju, koje je najniže energije, veća nego vjerojatnost da se molekula nalazi u pobuđenom vibracijskom stanju. Prema tome, raspršenje pri kojem je energija izlaznog zračenja manja nego energija upadnog zračenja je veće vjerojatnosti jer će najviše molekula prije interakcije s elektromagnetskim zračenjem biti u osnovnom stanju. Samim time su i Stokesove vrpce intenzivnije od anti-Stokesovih vrpce i uglavnom su samo one vidljive u Ramanovom spektru.²

$$p_i \propto e^{\frac{-\varepsilon_i}{kT}} \quad (2.1)$$

Povećanje ili smanjenje energije prilikom Ramanovog raspršenja je povezano s razlikama energije između vibracijskih stanja pojedine molekule, tj. različite molekule daju Stokesove i anti-Stokesove vrpce različitih valnih brojeva, ovisno o strukturi, te se prema tome mogu razlikovati.³

S obzirom da je Ramanov efekt male vjerojatnosti, slabijeg je inteziteta od ostalih mogućih efekata te često u potpunosti prekriven fluorescencijom. Do fluorescencije dolazi kada molekula apsorpcijom elektromagnetskog zračenja prelazi u viša pobuđena elektronska stanja, nakon čega se emisijom zračenja vraća u osnovno elektronsko stanje. Prekrivanje Ramanovog raspršenja fluorescencijom može se izbjeći primjenom FT-Ramanove spektroskopije kod koje se primjenjuju izvori koji emitiraju zračenje u bliskom infracrvenom području, čija energija nije dovoljna za elektronske prijelaze. S druge strane, rezonantna Ramanova spektroskopija koristi pobudu zračenjem frekvencije bliske frekvenciji elektronskih prijelaza, uslijed čega se raspršenje pojačava do 10^6 puta. Metoda je primjenjiva za analizu spojeva koji u svojoj strukturi sadrže kromofore, odnosno strukturne jedinice bogate elektronima (npr. porfirnski prsten, poliacetileni).



Slika 2.3. Fluorescencija (v i v' su vibracijski kvantni brojevi vibracijskih stanja u osnovnom i pobuđenom stanju, a ν_0 i ν_F frekvencija upadnog zračenja i frekvencija fluorescencije).²

Da bi vibracija bila vidljiva u Ramanovom spektru, mora uzrokovati promjenu polarizabilnosti, što je osnovno izborno pravilo Ramanove spektroskopije. Polarizabilnost je sposobnost preraspodjele elektrona u molekuli.

Za razliku od Ramanove spektroskopije, u infracrvenoj (IR) spektroskopiji detektiraju se vibracije uslijed kojih se mijenja dipolni moment, a čija je promjena obrnuto proporcionalna promjeni polarizabilnosti.² Zbog toga su Ramanova spektroskopija i IR spektroskopija komplementarne metode. Pravilo komplementarnosti govori da za molekule koje imaju centar simetrije, vibracije koje se detektiraju u Ramanovom spektru se ne detektiraju u IR spektru. U slučaju asimetričnih molekula, neke vibracije, ali ne nužno sve, mogu se detektirati i u Ramanovom spektru i u IR spektru, ali će im se intezitet razlikovati, tj. vrpce jakog inteziteta u Ramanovom spektru će u IR spektru biti slabijeg inteziteta, i obrnuto. Zbog pravila komplementarnosti, uspoređujući Ramanov i IR spektar neke molekule, možemo doći do informacija o simetričnosti te molekule. Ukoliko Ramanov i IR spektar nemaju zajedničkih vrpce, možemo zaključiti da ta molekula ima centar simetrije.³

Gibanja višeatomne molekule mogu se opisati stupnjevima slobode. Tri stupnja slobode pripadaju translacijskom gibanju molekule u smjeru tri osi u prostoru. Tri stupnja slobode odgovaraju rotacijskom gibanju molekule, osim u slučaju linearnih molekula kada su moguće samo dvije rotacije jer se rotacija oko osi molekule ne smatra rotacijskim gibanjem. Prema tome

broj vibracijskih stupnjeva slobode molekule računa se pomoću sljedećih izraza: $3N-6$ za nelinearne molekule i $3N-5$ za linearne, gdje je N broj atoma u molekuli. Za dvoatomnu molekulu, npr. O_2 , to znači da postoji samo jedan vibracijski stupanj slobode i predstavlja istežanje veze $O-O$, uslijed koje se mijenja polarizabilnost, ali ne i dipolni moment. Prema tome, kisik ima Ramanov spektar, ali ne i IR spektar. Molekula NO također ima samo jedan vibracijski stupanj slobode, ali uslijed istežanja veze $N-O$ mijenja se i polarizabilnost i dipolni moment te ima i Ramanov i IR spektar.

Vibracije višeatomnih molekula se dijele na istežne i deformacijske vibracije. Istežne vibracije (slika 2.4.) mogu biti simetrične ili antisimetrične. Kod simetričnih vibracija se oba atoma gibaju istovremeno u suprotnim smjerovima u ravnini, pri čemu se duljina svih veza mijenja jednako, dok se kod antisimetričnih vibracija oba atoma gibaju u istom smjeru u ravnini.

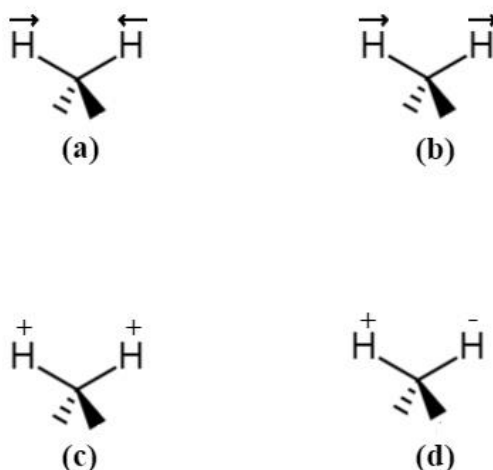


Slika 2.4. Istežne vibracije molekule CO_2 : simetrično istežanje (a); asimetrično istežanje (b).

Ako uzmemo u obzir heteroatomne molekule s tri atoma, simetrično istežanje uzrokuje veliku promjenu polarizabilnosti, ali malu promjenu dipolnog momenta, dok asimetrično ima suprotan efekt. Na primjeru molekule ugljikovog dioksida, simetrično istežanje dviju veza $C=O$ uzrokuje promjenu polarizabilnosti molekule i vibracija je aktivna u Ramanovom spektru. Asimetrično istežanje tih dviju veza uzrokuje značajnu promjenu dipolnog momenta molekula, ali ne i promjenu polarizabilnosti. Asimetrično istežanje veza $C=O$ aktivno je u IR spektru s vrpcom jakog inteziteta, dok vrpca u Ramanovom spektru izostaje.

Deformacijske vibracije se dijele na deformacije u ravnini i deformacije izvan ravnine. U deformacije u ravnini ubrajaju se striženje (engl., *scissoring*), kretanje atoma koji zatvaraju kut u suprotnim smjerovima u ravnini, i zibanje (engl., *rocking*), kretanje atoma koji zatvaraju kut u istom smjeru u ravnini. Kod striženja se mijenja kut između tri atoma koja zatvaraju kut, dok kod zibanja ne. Deformacija izvan ravnine se dijele na klaćenje (engl. *wagging*), kretanje atoma koji zatvaraju kut u istom smjeru van ravnine, i uvijanje (engl. *twisting*), kretanje atoma koji zatvaraju kut u različitom smjeru van ravnine. Promjena kuta se događa u slučaju uvijanja, ali ne i klaćenja.

Deformacijske vibracije su ilustrirane na primjeru metilenske $-\text{CH}_2-$ skupine na slici 2.5. Deformacijske vibracije su aktivne i u IR spektru i u Ramanovom spektru jer se prilikom njih mijenja i dipolni moment i polarizabilnost molekule.



Slika 2.5. Deformacijske vibracije: striženje (a); zibanje (b); klačenje (c); uvijanje (d).

Općenito, ukoliko se radi o homoatomnim molekulama, jedino simetrične vibracije uzrokuju promjene polarizabilnosti i vidljive su u Ramanovom spektru. U slučaju heteroatomnih molekula, i simetrične i asimetrične vibracije mogu uzrokovati promjenu polarizabilnosti molekule. Ovo pravilo teže je primjeniti kod kompleksnih molekula zbog velikog broja vibracijskih stupnjeva slobode. Zbog toga se kod interpretacije spektara složenijih molekula asigniraju vrpce karakteristične za vibracije određenih funkcionalnih skupina. Simetrične funkcionalne skupine, poput veze $\text{C}=\text{C}$, uglavnom daju intezivnu vrpcu u Ramanovom spektru i vrpcu slabog inteziteta u IR spektru, dok asimetrične funkcionalne skupine, poput karbonilne skupine, daju vrpce jakog inteziteta u IR spektru, a slabog u Ramanovom spektru. Područja frekvencija vibracija funkcionalnih skupina dostupna su literaturnim bazama podataka ili se računaju DFT metodom (engl. *density-functional theory*), koja se češće koristi za potvrdu točnosti već asigniranih vrpca.⁴

Ramanova spektroskopija može se koristiti za analizu krutih, tekućih i plinovitih uzoraka. Za snimanje tekućih uzoraka koriste se kivete od stakla ili kvarca različitih oblika. Kruti uzorci se usipavaju u staklenu kapilaru ili se nanose na nosač od aluminijsa nakon što su prethodno

usitnjeni u prah ili se pripremaju kao KBr pastile, što vrijedi većinom za uzorke koji su skloni raspadu pri povišenim temperaturama.

S obzirom da voda slabo raspršuje zračenje, Ramanovom spektroskopijom mogu se snimati uzorci koji sadrže vodu, što je važno kod snimanja anorganskih i biološki važnih spojeva. U anorganskoj kemiji Ramanova se spektroskopija koristi za analizu koordinacijskih spojeva metala jer je vrpca istezanja veze metal-ligand, koja se nalazi pri valnim brojevima 700–100 cm^{-1} , intenzivnija od odgovarajuće vrpce u IR spektru. Velika prednost Ramanove spektroskopije kod istraživanja biološki važnih spojeva je da se u spektrima opaža manji broj vrpca pa je u smjesama spojeva prekrivanje vrpca rjeđe.

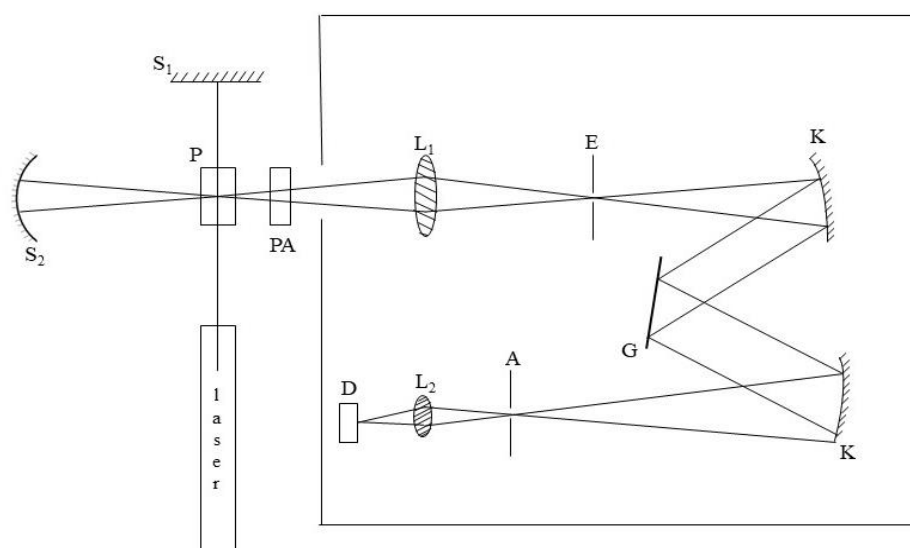
Ramanova spektroskopija koristi se i za analizu organskih spojeva, npr. kod analize alkena, s obzirom na to da je vrpca za istezanje dvostruke veze $\text{C}=\text{C}$ jakog inteziteta u Ramanovom spektru.

Sve veća primjena Ramanove spektroskopije direktno je povezana s većom komercijalnom dostupnosti relativno povoljnih Ramanovih spektrometara, za razliku od razdoblja prije upotrebe modernih lasera.⁵

2.1.2. Ramanov spektrometar

Disperzivni Ramanov spektrometar (slika 2.6) sastoji se od nekoliko osnovnih elemenata: izvora zračenja, zrcala, leća, ulazne i izlazne pukotine, difrakcijske rešetke i detektora. Da bi se Ramanovo raspršenje moglo detektirati moraju se koristiti izvori intenzivnog zračenja. Do šezdesetih godina koristili su se izvori zračenja slabijeg inteziteta (niskotlačni živini izvori), zbog kojih je bila potrebna veća količina uzorka za analizu nego danas, a snimanje spektra trajalo je satima. Danas se najčešće primjenjuju laseri, čime se gustoća zračenja povećala za 10 redova veličine. Razvojem lasera, Ramanova spektroskopija sve češće se nalazi u upotrebi jer se znatno smanjila količina uzorka potrebna za analizu te cijena proizvodnje instrumenta. Najčešće korišten laser u disperzivnom Ramanovom spektrometru je argon-ionski laser ($\lambda = 514,5 \text{ nm}$ ili $\lambda = 488,0 \text{ nm}$) snage zračenja reda veličine vata (W). Monokromatsko zračenje iz izvora raspršuje se na uzorku i zrcalima (S_1 i S_2) koja udvostručuju intenzitet raspršenog zračenja te usmjeravaju zračenje prema monokromatoru. Prvom lećom L_1 zračenje se fokusira na ulaznu pukotinu (E), a drugom lećom L_2 na detektor. Rešetka (G) služi za spektralno razlučivanje zračenja, koje zatim prolazi kroz izlaznu pukotinu i završava na detektoru. Ovisno

o pobudnom zračenju, koriste se različiti detektori. Za zračenje u vidljivom dijelu spektra, najčešće se koriste fotomultiplikatori, iako se danas sve više primjenjuju višekanalni detektori.



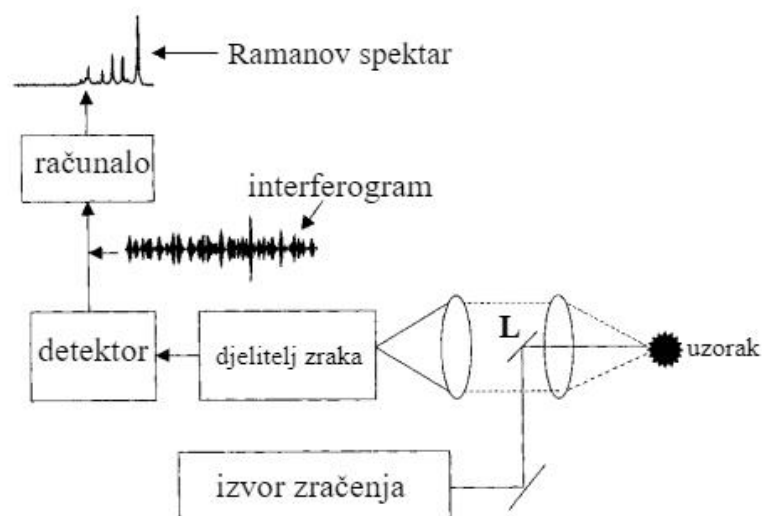
Slika 2.6. Shema disperzivnog Ramanovog spektrometra² (P – uzorak, PA – polarizacijski analizator, S₁ i S₂ – zrcala, L₁ i L₂ – leće, E – ulazna pukotina, A – izlazna pukotina, G – rešetka, K – sabirna zrcala, D – detektor).

Ramanov spektrometar s Fourierovim transformacijama se od disperzivnog Ramanovog spektrometra razlikuje prema izvoru zračenja i spektralnom uređaju. Dok disperzivni Ramanovi spektrometri koriste izvore zračenja u vidljivom dijelu spektra, u FT-Ramanovom spektrometru koriste se izvori zračenja u bliskom infracrvenom dijelu spektra, najčešće Nd:YAG laser (itrij aluminijev granat dopiran atomima neodimija) koji emitira zračenje pri 1064 nm. Dugovalna pobuda u FT-Ramanovoj spektrometriji je energije nedovoljne za prijelaz elektrona u viša elektronska stanja, čime je izbjegnuta fluorescencija pa je i obojene tvari koje fluoresciraju moguće analizirati Ramanovom spektroskopijom.

Ramanov spektrometar s Fourierovim transformacijama (slika 2.7) sastoji se od interferometra koji sadrži djelitelj zrake i detektor za zračenje u bliskom infracrvenom području (InGaAs ili Ge). Kod FT-Ramanovog spektrometra podatci se isprva ne skupljaju u obliku spektra, već inteferograma, koji prikazuje ovisnost intenziteta svih frekvencija zračenja iz izvora o vremenu. Te se informacije prevode u spektar koji prikazuje ovisnost inteziteta zračenja o valnom broju koristeći matematičke metode Fourierove transformacije.

Također, važni za Ramanov spektar s Fourierovim transformacijama su i efikasni filtri za uklanjanje intenzivnog Rayleighovog raspršenja.⁶

FT-Ramanov spektrometar daje spektre visoke spektralne razlučivosti i visoke točnosti valnih brojeva, a velika je prednost FT-Ramanove spektroskopije što spektri nisu zasjenjeni fluorescencijom koja predstavlja veliku prepreku kod disperzivne Ramanove spektroskopije. Nedostatci FT-Ramanove spektroskopije su potreba za iznimno preciznom mehanikom i optikom te lošiji detektori od inače dostupnih za, na primjer, disperzivne Ramanove spektrometre.²

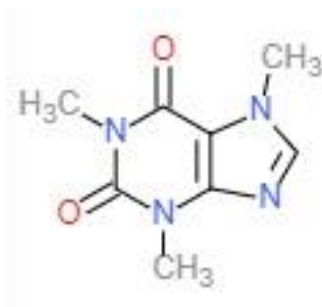


Slika 2.7. Shema FT-Ramanovog spektrometra⁷ (L– sustav leća za raspršivanje zračenja i filtri za uklanjanje Rayleighovog raspršenja).

2.2. Kofein

Kofein (1,3,7-trimetilksantin, slika 2.8.) je alkaloid koji se u prirodi nalazi u mnogim biljkama, prvenstveno u flori Južne Amerike i istočne Azije. Kofein je derivat ksantina koji je purinska baza. Molekulska formula kofeina je $C_8H_{10}N_4O_2$.

U većim koncentracijama može se naći prvenstveno u sjemenkama kave i guarane, ali i u drugim biljkama poput kineskog čaja, kakaa i kole. Prvi put je otkriven i izoliran iz sjemenki kave od strane njemačkog kemičara Friedricha Ferdinanda Rungea 1820. godine. Čisti kofein je kristalna bijela supstanca bez mirisa i gorkog okusa. Dobro je topljiv u vodi i organskim otapalima. Zbog svoje dobre topljivosti u organskim otapalima, iz prirodnih izvora se može izdvojiti postupkom ekstrakcije, što se koristi u industrijskom dobivanju pročišćenih ekstrakta kofeina.⁸



Slika 2.8. Molekulska struktura kofeina.

Kofein je stimulans centralnog živčanog sustava. Strukturni je analog adenzina za čije se receptore veže te time sprječava vezanje adenzina i djeluje kao kompetitivni inhibitor. Obzirom da adenzin snižava otkucaje srca, inhibicijom njegovog vezanja kofein povećava osjećaj budnosti i koncentracije. Iz tog razloga se kofein jako često konzumira diljem svijeta i nalazi se u mnogim komercijalno dostupnim proizvodima poput kave, čaja, energetskih pića te raznih dodataka prehrani (tablete ekstrakta guarane).⁹

Također su uočena neka anti-oksidativna svojstva kofeina. Koristeći metodu elektronske spinske rezonancije, dokazana je reakcija kofeina s hidroksilnim radikalom koji nastaje reakcijom Fe^{2+} s vodikovim peroksidom.⁸

U prirodi se kofein može naći u tri pseudopolimorfna oblika: u dva anhidratna oblika i monohidratnom obliku. Monohidratni oblik nalazi se u kristalnoj formi te dehidratacijom pri sobnoj temperaturi može prijeći u β -anhidratni oblik koji pak pri povišenim temperaturama prelazi u metastabilni α -anhidratni oblik. Anhidratni oblici i monohidratni oblik mogu se

međusobno razlikovati koristeći različite analitičke metode poput infracrvene spektroskopije, Ramanove spektroskopije, termogravimetrije, itd.¹⁰

Mnoga istraživanja bave se metaboličkim, neurološkim te fiziološkim efektima kofeina. Maksimalni preporučeni dnevni unos kofeina iznosi 400 mg za zdravu odraslu osobu, dok se prekomjerna konzumacija povezala s promjenama u građi kostiju i ravnotežom kalcija, kardiovaskularnim bolestima, povećanom vjerojatnosti karcinoma, nesanicom te smanjenjem plodnosti kod muškaraca.¹¹

2.3. Ramanov spektar kofeina

Kao što je spomenuto, kofein se može naći u tri različita pseudopolimorfna oblika različite stabilnosti i fizičkih svojstava: α -anhidratni oblik, β -anhidratni oblik i monohidratni oblik. Ramanovom spektroskopijom detaljno su analizirani spektri β -anhidratnog oblika i monohidratnog oblika kofeina.

Spektri su snimljeni pomoću FT-Ramanova spektrometra Nicolet NXR 9650 opremljenog s Nd:YAG laserom, koji emitira zračenje pri 1064 nm i germanijevim detektorom hlađenim tekućim dušikom. Uzorci za mjerenje dobiveni su iz sjemenki guarane i iz listova zelenog čaja. Također je analiziran i spektar čistog izoliranog kofeina proizvođača Merck.

Svi su spektri snimljeni sa spektralnim razlučivanjem od 4 cm^{-1} u području valnih brojeva od 4000 cm^{-1} do 100 cm^{-1} . Uzorci su pobuđivani zračenjem različitih snaga: 300 mW (čisti kofein), 110 mW (sjemenke guarane), 90 mW (listovi zelenog čaja), 200 mW (farmaceutski proizvodi). Snimljeni spektri obrađeni su koristeći programski paket Omnic/Thermo Scientific.

Dehidratizirani oblik kofeina je komercijalno dostupan, dok se monohidratni oblik kofeina može pripremiti prekrizacijom anhidratnog oblika kofeina u vodi. Pri rukovanju uzorkom treba obratiti pažnju i na činjenicu da samim izlaganjem dehidratiziranog uzorka kofeina vlazi u zraku dolazi do prijelaza u monohidratni oblik. Monohidratni i dehidratizirani oblici kofeina imaju različite Ramanove spektre (slika 2.9) s različitim karakterističnim vibracijskim vrpama (tablica 2.1). Po intenzitetu i položaju određenih vibracijskih vrpca u spektru ta dva oblika mogu se međusobno razlikovati s velikom točnošću.

Tablica 2.1. Asignacija karakterističnih vibracijskih vrpca monohidratnog i anhidratnog oblika kofeina.¹¹

Valni broj (cm ⁻¹)		Asignacija vrpce
Hidrat	β-Anhidrat	
3121m	3113m	v (=CH)
2955m	2977s	v (CH ₃)
1698s	1698s, 1656m	v (C=O)
1605s	1600m	v (C=C)
1551w	1554w	v (C-C)
1409m	1408w	v (CN)
1361m	1360m	v (CN)
1333s	1328s	v (CN)
1290m	1284m	v (CN)
1255m		δ (H-C=N)
1076w	1073w	δ (C-C)
930w	928w	δ imidazolni prsten
890w		λ (H ₂ O)
647m	644m	δ (O=C-N)
555s	556s	δ (O=C-N)

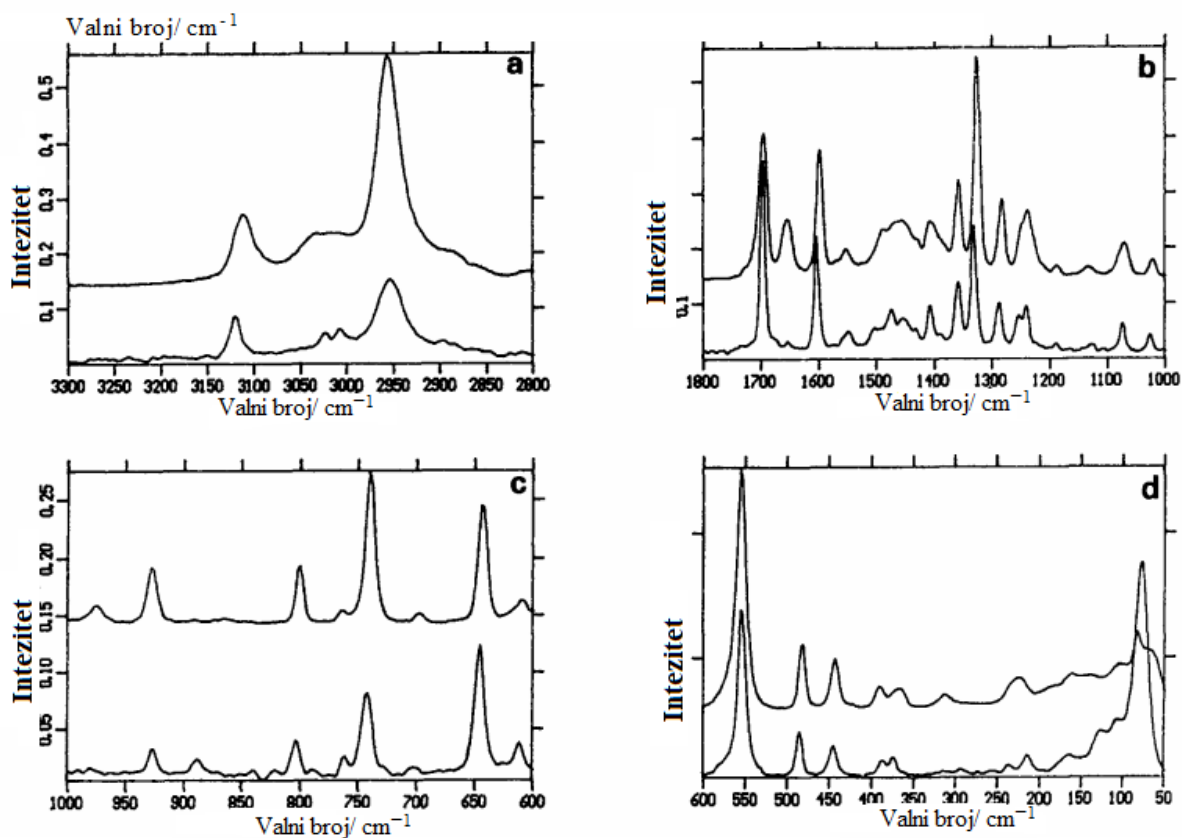
Kratice: s-jako, m-srednje jako, w-slabo, v-istezanje, δ-deformacija, λ-libracija

Hidrat i anhidrat razlikuju se po izgledu i prisutnosti vrpca pri 1698 cm⁻¹ i 1656 cm⁻¹, koje odgovaraju istežanju karbonilne veze C=O. U Ramanovom spektru anhidratnog oblika kofeina se pojavljuju i vrpca pri 1698 cm⁻¹ jakog inteziteta i vrpca pri 1656 cm⁻¹ srednjeg inteziteta, dok se kod monohidratnog oblika pojavljuje samo vrpca pri 1698 cm⁻¹. Razlika je posljedica promjene kristalne strukture, uslijed nastanka vodikovih veza prilikom hidratacije. Ova razlika u strukturi potvrđena je na primjeru teofilina, koji je kao i kofein derivat ksantina, metodom difrakcije rentgenskog zračenja. U hidratiziranom obliku svi akseptori vodikove veze (uključujući i karbonilne skupine) sudjeluju u stvaranju vodikovih veza pa zbog toga izostaje signal za karbonilnu vezu pri 1656 cm⁻¹. Kod anhidratnog oblika karbonilne skupine ne sudjeluju u vodikovim vezama te se stoga pojavljuju dvije vrpce karakteristične za dvije

karbonilne skupine. Također je razlika vidljiva intenzitetu vrpce pri $1605\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ koja je intenzivnija u spektru monohidratnog oblika nego u spektru anhidratnog.

Druge razlike u Ramanovim spektrima anhidratnog oblika kofeina i monohidratnog su širenje vibracijske vrpce istezanja veze $=\text{C-H}$ pri 3121 cm^{-1} , smanjenje inteziteta vibracijske vrpce istezanja dvostruke veze C=N pri 1454 cm^{-1} , izostanak vibracijske vrpce deformacije skupine H-C=N pri 1255 cm^{-1} i vibracijske vrpce pri 890 cm^{-1} koja upućuje na nedostatak molekule H_2O kod anhidratnog oblika kofeina.

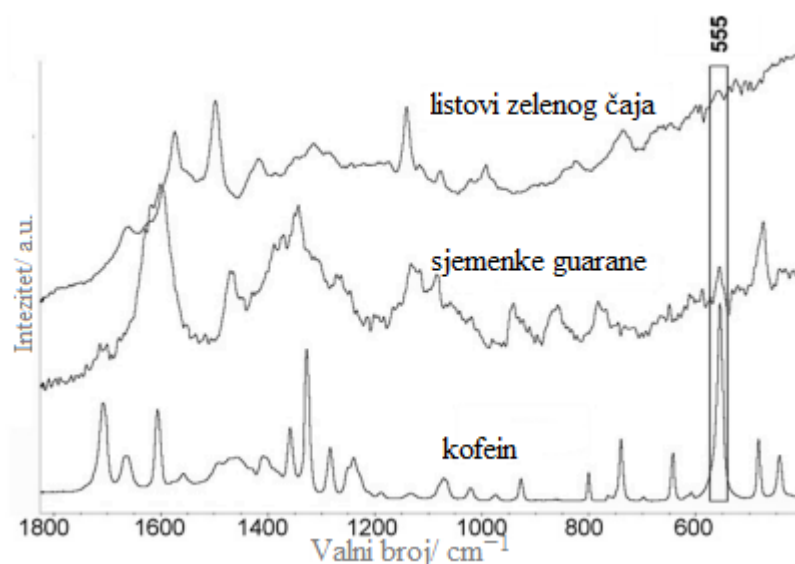
Na osnovu navedenih razlika u Ramanovim spektrima se s velikom točnošću može utvrditi je li uzorak kofeina u monohidratnom ili dehidratiziranom obliku.¹¹



Slika 2.9. Ramanovi spektri anhidratnog oblika (gornja linija) i hidratnog oblika (donja linija). Spektralna područja: $3300\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ (a); $1800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ (b); $1000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ (c); $600\text{--}50\text{ cm}^{-1}$ (d).¹²

Na slici 2.10. prikazani su Ramanovi spektri sirovih biljnih uzoraka (sjemenke guarane i listovi zelenog čaja) u usporedbi s Ramanovim spektrom čistog kofeina. Kofein se u Ramanovim

spektrima i sjemenki guarane i listova zelenog čaja može identificirati prvenstveno po vibracijskoj vrpici pri 555 cm^{-1} . Većina karakterističnih vrpica kofeina je u snimljenim biljnim uzorcima djelomično ili u potpunosti zasjenjena vibracijskim vrpicama škroba, raznih proteina, resina, masti i tanina pa se ne može s velikom sigurnošću odrediti radi li se o anhidratnom ili monohidratnom obliku kofeina. U slučaju Ramanovog spektra sjemenki guarane slabo je vidljiva vrpca pri 1658 cm^{-1} , što indicira da se radi o anhidratnom obliku. Kod Ramanovog spektra listova zelenog čaja je vidljiva vrpca pri 1656 cm^{-1} , što se može prepisati anhidratnom obliku. Međutim, obje navedene vrpce pri 1656 cm^{-1} i 1658 cm^{-1} se ne mogu s velikom točnošću asignirati kao vrpce koje potječu od molekule kofeina obzirom da se u istom valnom području detektiraju karakteristične vibracijske vrpce istezanja karbonilne skupine drugih biljnih komponenti, poput masti, proteina i smola.



Slika 2.10. Ramanov spektar kofeina (donji), sjemenki guarane (srednji) i listova zelenog čaja (gornji).¹¹

2.4. Određivanje kofeina u energetske pićima

SP-FT Ramanova spektroskopija (eng. *solid-phase Fourier transform Raman spectroscopy*) razvijena je metoda za kvantitativno određivanje kofeina u energetske pićima. Standardna metoda određivanja kofeina u bezalkoholnim pićima koju je propisala Udruga kemičara u poljopivredi (engl. *Association of Official Agricultural Chemists*, AOAC) također se temelji na spektroskopskim mjerenjima, ali se uzorak prvo obrađuje na celitnim kolonama u bazičnom ili kiselom mediju, što oduzima puno vremena i materijala.

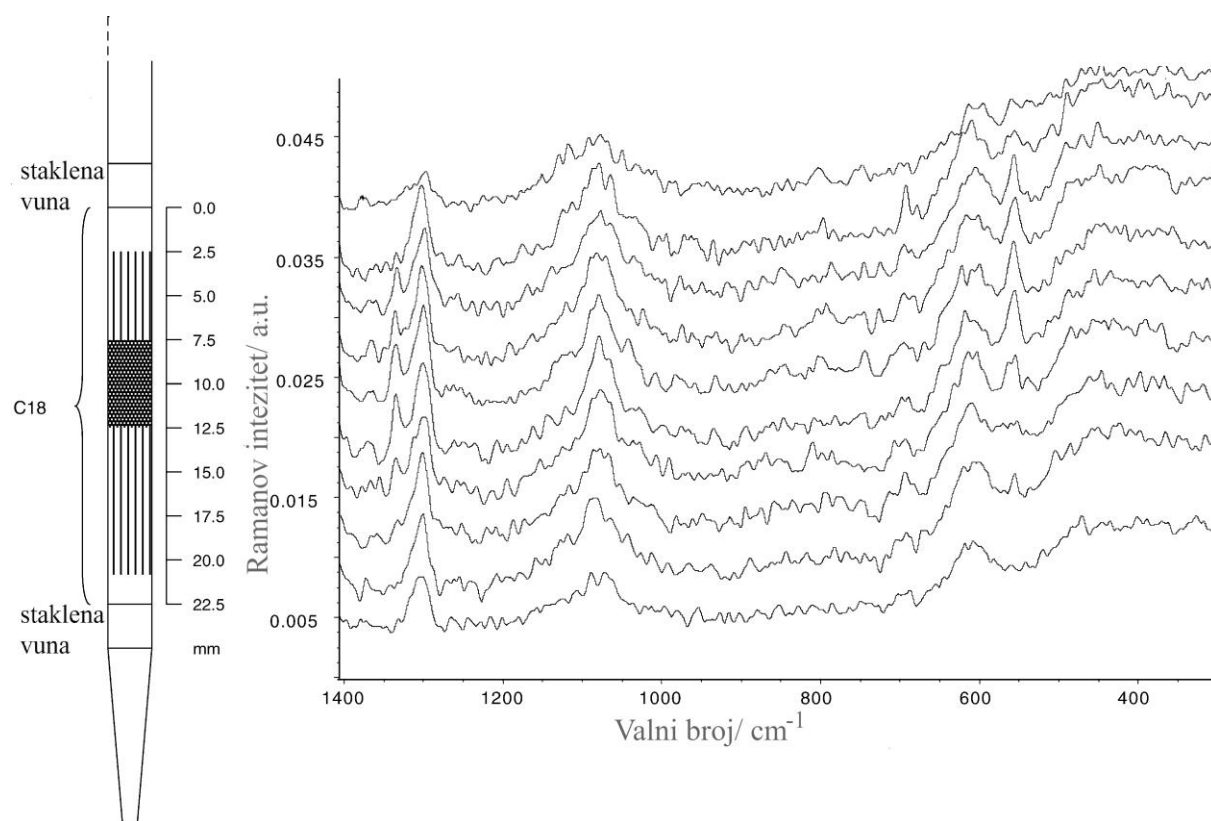
Za snimanje Ramanovih spektara korišten je FT-Ramanov spektrometar RFS 100/S tvrtke Bruker s izvorom zračenja u NIR području (1064 nm) maksimalne snage od 2 W. Snimani su spektri uzoraka na čvrstoj fazi u staklenim cijevima promjera 5 mm. Za obradu snimljenih spektara korišteni su programski paketi Omnic 2.1 i Omnic Macros 2.1.

Kao referentna metoda korištena je tekućinska kromatografija uz detekciju u UV dijelu spektra (LC-UV). Tekućinski kromatograf oznake P680 tvrtke Dionex opremljen kolonom s inverznom fazom C18 tvrtke Kromasil korišten je za kvantitativno određivanje kofeina u referentnim uzorcima. Referentni uzorak kofeina za tekućinsku kromatografiju pripremljen je na način da je 1 do 2 mg uzorka izvagano i otopljeno u 10 mL vode. Otopina je zatim filtrirana kroz najlonski filter te je 20 μL otopine injektirano u mobilnu fazu uz brzinu protoka 1 mL min^{-1} . Kao mobilna faza korištena je smjesa metanola i vodene otopine kalijeva dihidrogenfosfata, $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$, u omjeru 55:45 (pH=3,2). Udio kofeina određen je mjerenjem apsorbancije pri 275 nm. Kalibracijska krivulja izrađena je pomoću 6 uzoraka poznate koncentracije kofeina u rasponu od 15,3 mg L^{-1} do 44,8 mg L^{-1} , nanošenjem integrirane vrijednosti intenziteta pika retencijskog vremena 3,50 min u ovisnosti o koncentraciji uzorka.

Za snimanje FT-Ramanovog spektra kofeina, staklena kolona promjera 5 mm napunjena je s po 300 mg čvrstih faza LC-SAX i C18, koje su odvojene fazom staklene vune te je kolona aktivirana s po 2 mL metanola i vode. Na čvrstu fazu nanoseno je 10 mL uzorka kofeina nepoznate koncentracije uz brzinu protoka od 7,5 mL min^{-1} , nakon čega je kolona isprana s 20 mL destilirane vode i osušena strujom dušika. Kolona je postavljena u nosač za uzorke u instrumentu te je Ramanov spektar snimljen direktno na čvrstoj fazi na udaljenosti 10 cm od vrha stupca faze C18. Maksimum analitičkog signala opažen je na udaljenosti između 7,5 cm i 12,5 cm od vrha stupca (slika 2.11) te je udaljenost od 10 cm uzeta kao srednja vrijednost. Spektralno razlučivanje bilo je 4 cm^{-1} i broj prikupljenih snimki po spektru je iznosio 50. Snaga Nd:YAG lasera bila je 1500 mW. Kalibracijska krivulja izrađena je na temelju FT-Ramanovih

spektara 10 različitih uzoraka kofeina poznatih koncentracija u rasponu od 100 mg L^{-1} do 600 mg L^{-1} , adsorbiranih na čvrstoj fazi na isti način kao i nepoznati uzorci. Kofein se nakon svakog snimanja uklanjao s kolone ispiranjem s 3 mL metanola i 5 mL destilirane vode.

Promatran je intezitet vrpce u području valnih brojeva $580\text{--}540 \text{ cm}^{-1}$ i $1354\text{--}1323 \text{ cm}^{-1}$ zbog toga što su te vibracijske vrpce bile najbolje definirane i razlučene neovisno o pozadinskim signalima drugih tvari u uzorku i koloni (granice detekcije 18 mg L^{-1}). Vibracijska vrpca u području valnih brojeva $580\text{--}540 \text{ cm}^{-1}$ odgovara deformaciji skupine C-N-CH_3 , a vrpca u području valnih brojeva $1354\text{--}1323 \text{ cm}^{-1}$ istežanju jednostruke veze C-N . Slabije intenzivne vrpce pri 1600 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} i 1241 cm^{-1} pripisane su istežanju veze C=C , simetričnom istežanju karbonilne veze C=O te istežanju veze C-N .



Slika 2.11. Distribucija kofeina kroz stacionarnu fazu C18 u 5 mm kromatografskoj cijevi punjenoj s 300 mg čvrste faze¹² (10 mL otopine kofeina masene koncentracije 400 mg L^{-1}).¹³

Metodom SP-FT-Ramanove spektroskopije i tekućinske kromatografije analizirani su uzorci nekoliko različitih komercijalno dostupnih energetskih pića. Rezultati dobiveni SP-FT Ramanovom spektroskopijom uzoraka pokazali su dobro slaganje s rezultatima tekućinske kromatografije (tablica 2.2). Ovime se SP-FT-Ramanova spektroskopija pokazala kao

zadovoljavajuća alternativa široko korištenoj tekućinskoj kromatografiji koja u ovom slučaju traje skoro dvostruko duže. Naime, SP-FT-Ramanovom spektroskopijom u prosjeku se analizira 13,3 uzoraka po satu, dok je prosjek za tekućinsku kromatografiju 7 uzoraka po satu. K tomu, za SP-FT Ramanovu spektroskopiju potrebno je manje reagensa i otapala nego za tekućinsku kromatografiju. Također, kombinacija metode zadržavanja na čvrstoj fazi i FT-Ramanove spektroskopije povećava osjetljivost i selektivnost FT-Ramanove spektroskopije.¹³

Tablica 2.2. Masena koncentracija kofeina u različitim uzorcima energetskih pića izmjerena LC-UV i SP-FT-Ramanovom metodom.¹³

Uzorak	LC-UV ($\gamma(\text{kofein})/\text{mg L}^{-1}$)	SP-FT-Raman ($\gamma(\text{kofein})/\text{mg L}^{-1}$)
Burn	225,6 ± 0,5	221 ± 7
Burn (b.š.)	224,8 ± 0,6	230 ± 8
Red Bull	235,5 ± 1,0	235 ± 6
Red Bull (b.š.)	240,7 ± 0,3	238 ± 6
Mountain dew	308,7 ± 1,5	305 ± 6
Hacendado	106,4 ± 0,9	108 ± 6
Carrefour	243,7 ± 0,2	247 ± 6
Big puma	241,0 ± 1,4	239 ± 4
Non-stop(naranča)	111,4 ± 0,5	110 ± 4
Non-stop(limun)	109,4 ± 0,5	106 ± 5
Locura	197,2 ± 0,5	198 ± 7
Locura (b.š.)	213,91 ± 0,06	218 ± 6

*b.š.–bez šećera

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. https://www.periodni.com/gallery/spektar_elektromagnetskog_zracenja.png (datum pristupa 23. kolovoza 2020.)
2. H. Gunzler, H. U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006., str. 31–254.
3. C. N. Banwell, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, McGraw Hill, London, 1983., str. 127.
4. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons, Norwich, 2005., str. 30–31., str. 93.
5. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2007., str. 488–493.
6. J. L. Koenig, *Spectroscopy of Polymers*, Elsevier Science, New York, 1999., str. 228.
7. R. L. McCreery, *Raman spectroscopy for Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, New York, 2000., str. 93.
8. F. Agyemang-Yeboah, S. Y. Oppong, *Research Signpost* **661** (2013) 27–37.
9. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00201#pharmacology> (datum pristupa 24. rujna 2019.)
10. M. Baranska, L. M. Proniewicz, *Vib. Spectrosc.* **48** (2008) 153–157.
11. P. Nawrot, S. Jordan, J. Eastwood, J. Rotstein, A. Hugenholtz, M. Feeley, *Food Add. and Cont.* **20** (2003) 1–30.
12. M. de Matas, H. G. M. Edwards, E. E. Lawson, L. Shields, P. York, *Journal of Mol. Struct.* **440** (1998) 97–104.
13. S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* **547** (2005) 175–180.