

Nápojový průmysl

Stanovenie chinínu a kofeínu v nealkoholických nápojoch

683.81
547.94 547.857

Doc. Ing. ALEXANDER PRÍBELA, CSc., Katedra chémie a technológie sacharidov a potravín CHTF, Bratislava
Ing. KAROL TOMÁŠEK, CSc., Pivovary a sladovne, GRT, Bratislava
Ing. BOŽENA MEDOVARSKÁ, Výskumný ústav pôdoznamecký a výživy rastlín, Bratislava

Výroba nealkoholických nápojov za posledné roky enormne vzrástla a má stále stúpajúcu tendenciu. Príčinou tohto stavu je najmä zhoršujúca sa akosť pitnej vody, rozvoj motorizmu a s ním súvisiaci zákaz požívania alkoholických nápojov šoférmi. Aj výživové a dietetické hľadiská tu zohrávajú určitú úlohu, pretože mnohé nealkoholické nápoje predstavujú aj nezanedbateľný príjem dôležitých nutričných a senzorických zložiek (vitamíny, minerálne soli, aromatické a chuť podporujúce látky). Osobitnú skupinu tvoria nealkoholické nápoje obsahujúce psychicko-stimulatívne zložky najmä alkaloidy, heteroglykozidy, prípadne iné senzorycky aktívne zložky. Z tejto skupiny najväčší trend spotreby zaznamenávajú nealkoholické nápoje na báze chinínu, kofeínu (v menšej miere tiež teobromínu), ktoré majú aj špecifické farmakodynamické účinky na ľudský organizmus. Tieto zložky sú preto predmetom záujmu kontroly hygienických, ale i výrobných orgánov [1, 2].

Pri výbere metód pre stanovenie uvedených látok treba sa riadiť druhom vzorky, požiadavkami na presnosť, citlivosťou, časovou a technickou náročnosťou. Z praktického hľadiska sú výhodné také stanovenia, ktoré nevyžadujú zdĺhavé čistiacie a rozdeľovacie techniky a pritom poskytujú dostatočne presné a spoľahlivé výsledky.

Na stanovenie chinínu boli vypracované početné metódy založené na spektrálnych princípoch najmä meraní fluorescencie [3–4] a absorpcie v UV-oblasti [5–7]. Špecifickosť týchto metód je odvislá od množstva interferujúcich látok vo vzorke. Spektrofotometrické a fluorimetrické merania sú vhodné pre čisté roztoky, nealkoholické nápoje typu Chito, zatiaľ čo pre nápoje z prirodzených extraktov je priame stanovenie zafarbené značnými chybami. V takýchto prípadoch sa buď použijú špeciálne čistiacie operácie (napr. extrakcia chloroformom z alkalického prostredia) alebo rozdeľovacie techniky, najmä chromatografia na tenkej vrstve, stĺpcová chromatografia na silikagéli apod. [8, 9]. Rozdelené chromatogramy sa vyhodnotia buď denzitometricky priamo na tenkých vrstvách, alebo po vyeluvaní škvrn. Na fluorimetrické stanovenie vplýva obsah chloridov a železa vo vzorke, pretože tieto látky zhasávajú fluorescenciu chinínu v závislosti od ich množstva. Pri niektorých metódach rušivo pôsobí aj kyslík uhličitý, a preto sa musí pred stanovením odstrániť [2, 5]. V poslednom čase bola rozpracovaná metóda plynovej chromatografie s vysokým stupňom automatizácie a vyhodnocovania výsledkov. Stanovenie touto technikou je špecifické a veľmi citlivé [10, 11].

Na stanovenie kofeínu bolo vypracovaných tiež množstvo metód, ktoré využívajú absorpciu v UV svetle [12, 16], fotometriu reakčného produktu kofeínu s kyselinou fosfomolybdenovou alebo s kyselinou malónovou [17, 18]. Titračné metódy stanovenia kofeínu vychádzajú z chloroformových extraktov vzoriek alkali-zovaných amoniakom. Kofeín sa po vykryštalizovaní

titruje kyselinou chloristou [21]. Rovnako možno stanoviť kofeín po vyzrážaní jódou spätnou titráciou tiosíranom sodným [22]. Pri stanovení kofeínu spektrofotometricky je obsah interferujúcich látok (fenolické látky, triesloviny, produkty Maillardových reakcií) oveľa výraznejší než pri stanovení chinínu. Preto spravidla vždy, ak sa majú dosiahnuť exaktnejšie výsledky, musí sa vzorka čistiť cez stípec polyamidu (nečistoty sa absorbujú a kofeín prechádza do eluátu) alebo chromatografiou na tenkej vrstve [15, 16, 20, 23]. Výsledky sa vyhodnocujú priamo denzitometricky pri 272 nm [24]. Na stanovenie kofeínu bola vypracovaná tiež metóda plynovej chromatografie [10, 25].

Zriedkavejšie sa sleduje obsah teobromínu v nealkoholických nápojoch, ako sprievodný alkaloid vedľa kofeínu. Takmer pri všetkých metódach na stanovenie teobromínu sa využívajú deliace metódy spojené so spektrofotometrickou indikáciou [13, 17, 26]. Na oddelenie teobromínu a teofylínu je vypracovaná chromatografia na tenkej vrstve silikagelu s následným spektrofotometrickým stanovením pri 276 nm [27].

Experimentálna časť

V experimentálnej práci sme sa zamerali na preskúšanie a matematicko-štatistické zhodnotenie metód, na stanovenie kofeínu, chinínu a teobromínu.

Na stanovenie chinínu sme použili štyri metódy, ktoré sa ukázali metodicky a časovo nenáročné, vhodné najmä na rutinné použitie v nápojárskom priemysle. Išlo o fluorimetrické stanovenie chinínu podľa *Stacheho metódy* popísanej a modifikovanej *Nuijensom* a *Veldenom* [3]. Táto metóda je navrhnutá v ČSN 56 0240 [17]. Ďalej dve spektrofotometrické metódy. Prvá podľa *Heya* s extrakciou chinínu do chloroformu [7] a druhá podľa *Gílsa* a *Hidskesa*, kde sa priamo stanovuje absorbanca pri 347,5 mm [5]. Konečne titračná metóda s kyselinou chloristou po predchádzajúcej extrakcii s chloroformom [21].

Na stanovenie kofeínu a teobromínu sme preskúšali tri metódy, z toho dve na stanovenie len kofeínu (fotometrickú a titračnú metódu) a vážkovú metódu na stanovenie kofeínu a teobromínu popri sebe. Ako vzorky sme použili rôzne nealkoholické nápoje s obsahom chinínu a kofeínu, kávu a štandardné látky.

Výsledky a diskusia

Hodnoty v tab. 1 ukazujú štatistické údaje obsahu chinínu v nealkoholických nápojoch. Porovnaním vychádza, že relatívne najpresnejšie výsledky dáva spektrofotometrická metóda s extrakciou chinínu, kde miery presnosti na 5 % hladine významnosti (95 %) sú 1,4 až 3,7 %, recovery test 98,9–99,0 %. Podobne presné výsledky poskytuje fluorimetrická metóda s mierou presnosti 1,1–4,4 % a recovery testom 99,9 %.

Titračná metóda poskytuje rovnomerný rozptyl výsledkov s presnosťou 3 až 3,8 %. Relatívne najhoršie

Tabuľka 1. Štatistické údaje metód na stanovenie chinínu

Vzorka	n	\bar{x}	R	s	M' (%)	Rec. (%)
A. Fluorimetrická metóda						
Chito	5	15,39	0,793	0,341	4,4	—
Chito Tonic	5	29,56	0,867	0,373	2,5	—
Mirinda Tonic	5	37,76	0,900	0,387	2,1	—
Koral Tonic	5	48,66	0,866	0,372	1,5	—
Štandard	8	19,91	1,100	0,370	3,7	20
Štandard	8	19,99	0,300	0,105	1,1	20
B. Spektrofotometrická metóda s extrakciou						
Chito	5	15,29	0,666	0,286	3,7	—
Chito Tonic	5	28,44	0,466	0,200	1,4	—
Mirinda Tonic	5	37,48	0,730	0,314	1,7	—
Koral Tonic	5	50,11	1,499	0,623	2,5	—
Štandard	5	19,77	0,400	0,172	1,7	20
Štandard	5	39,59	0,756	0,325	1,6	40
Štandard	5	18,96	0,750	0,263	2,8	19,2
C. Spektrofotometrická metóda bez extrakcie (rýchlo metóda)						
Chito	6	16,90	1,500	0,597	7,0	—
Chito Tonic	5	37,20	2,000	0,860	4,6	—
Chito Tonic	5	42,75	0,510	0,219	1,0	—
Chito Tonic	4	40,51	1,950	0,510	2,5	—
Mirinda Tonic	5	50,95	1,200	0,516	2,0	—
Koral Tonic	5	52,70	0,900	0,387	1,5	—
Chito Tonic št. prídavok	6	1,92	0,350	0,350	36,5	1,98
Chito št. prídavok	6	1,93	0,270	0,106	11,0	1,98
Štandard	10	13,6	1,700	0,552	8,1	14,00
Štandard	10	22,0	1,500	0,487	4,4	24,25
Štandard	10	29,8	3,200	1,040	7,0	33,65
D. Titračná metóda						
Chito	5	15,51	0,648	0,279	3,6	—
Chito Tonic	5	29,39	1,040	0,447	3,0	—
Mirinda Tonic	5	37,68	1,656	0,715	3,8	—
Koral Tonic	5	49,12	1,944	0,836	3,4	—

výsledky dáva spektrofotometrická rýchlo metóda, kde miera presnosti kolíše 1,5 až 8,1 % a pri nízkych štandardných prídavkoch až 36 %. Spôľahlivosť vyjadrená recovery testom je 89 až 97,6 %.

Ak zrovnávame jednotlivé vzorky analyzované všetkými metódami (tab. 2), vidíme, že rýchlo metóda dáva vyššie výsledky než ostatné tri metódy, čo len potvrdzuje, že obsah interferujúcich látok pri priamej spektrofotometrii je štatisticky významný a nemožno ho zanedbať.

Vplyv CO₂ na výslednú hodnotu chinínu sme sledovali pri spektrofotometrickej a fluorimetrickej metóde. Zatiaľ čo pri prvej metóde je vplyv CO₂ zanedbateľný, pri druhej je veľmi dôležitá dôkladne vzorku dekarbonizovať, pretože hodnoty môžu byť o 2 až 4 % vyššie ako vo vzorke s nedokonalou odstránením CO₂. Pri spektrofotometrickej metóde je dôležitá aj extrakcia chinínu. Ak sme extrakciu opakovali 4krát oproti trojnásobnej, ako sa uvádza v metóde, zvýšil sa obsah o 0,4 až 6,4 % [28].

Výsledky preskúšaných metód na stanovenie kofeínu a teobromínu sú zhrnuté do tab. 3. Z nich vyplýva, že uvedené metódy poskytujú menej presné výsledky ako pri stanovení chinínu. Miera presnosti sa pri titračnej metóde pohybuje od 4,9 do 5,9 % a pri fotometrickej metóde od 5,3 do 17,2 %.

Recovery test pri fotometrickej metóde je pomerne nízky — 93,0 %. Zpätne stanovenie teobromínu pri vázkovej metóde je 97,5 %. Presnosť gravimetrickej metódy na stanovenie teobromínu podľa kofeínu je pomerne nízka.

Tabuľka 2. Porovnanie výsledkov stanovení chinínu rôznymi metódami

Vzorka	n	Fluorimetrická metóda (mg/l)	Extraktčná spektrofotometrická metóda (mg/l)	Spektrofotometrická metóda (mg/l)	Extraktčná titračná metóda (mg/l)
Chito	1	14,0	15,7	26,8	15,2
	2	15,8	15,2	27,6	15,9
	3	15,4	15,3	26,8	15,5
	4	15,4	15,3	27,6	15,6
	5	15,3	15,0	26,4	15,4
Chito Tonic	1	29,9	28,3	38,0	29,3
	2	29,3	28,6	37,2	28,9
	3	29,8	27,2	36,8	29,9
	4	29,8	28,4	38,0	29,2
	5	29,0	28,6	36,0	29,7
Mirinda Tonic	1	37,5	37,6	51,2	39,9
	2	37,5	38,3	51,2	38,6
	3	37,9	37,6	50,0	37,9
	4	38,4	38,0	51,2	37,2
	5	37,5	38,0	51,2	37,7
Koral Tonic	1	48,1	50,0	52,4	50,2
	2	49,7	50,3	52,4	49,2
	3	48,8	49,4	53,2	48,3
	4	48,9	50,6	53,2	49,2
	5	48,8	50,1	52,3	48,6

Tabuľka 3. Štatistické údaje metód na stanovenie kofeínu a teobromínu

Vzorka	n	\bar{x}	R	s	M' (%)	Rec. (%)
A. Fotometrická metóda — kofeín						
Kofola	5	62,22	8,470	3,641	11,7	—
Kofola	5	65,44	12,640	5,434	16,6	—
Slovkola	5	96,38	7,700	3,310	6,9	—
Coca-cola	5	111,50	19,250	8,276	14,8	—
Pepsi-cola	5	51,50	10,300	4,429	17,2	—
Pepsi-cola	5	65,31	10,090	4,338	13,3	—
Štandard	8	93,44	9,220	3,238	6,9	100,0
Štandard	5	18,49	1,148	0,493	5,3	20
B. Titračná metóda — kofeín						
Kofola	5	63,70	3,884	1,670	5,2	—
Coca-cola	5	112,25	7,768	3,339	5,9	—
Pepsi-cola	5	68,2	3,884	1,670	4,9	—
C. Gravimetrická metóda — kofeín, teobromín						
Káva Santos		0,550	0,975	—	—	1,0
Káva Santos + št. príd.		1,525	0,975	—	—	1,0

Záver

Zo štatistického zhodnotenia metód na stanovenie chinínu pre rutinnú kontrolu najpriaznivejšie vychádza fluorimetrická, ktorá je veľmi citlivá, relatívne špecifická, dostatočne presná a pritom časovo nenáročná — trvanie analýzy niekoľko minút. Vyžaduje vhodný fluorimeter, napr. Spekol s nastavcom. Vhodná čo do presnosti a správnosti je spektrofotometrická metóda s predchádzajúcou extrakciou. Je však menej citlivá (asi 10krát) a prácnejšia (jedno stanovenie s paralelkami trvá asi 1 hodinu). Vyžaduje sa spektrofotometer s meraním absorbancie v UV svetle. Titračné stanovenie chinínu je najmenej náročné na prístrojové vybavenie, je však náročné na čas (2 až 3 hodiny) a presnosť. Aj citlivosť je však nižšia než pri predchádzajúcich metódach. Priame spektrofotometrické meranie absorbancie je použiteľné len na čisté roztoky, inak poskytuje vyššie hodnoty.

Z preskúšaných metód na stanovenie kofeínu sa pre praktické účely ukázala vhodnejšia titračná metóda, ktorá je pomerne presná a časovo a prístrojovo menej náročná než fotometrická. Pre stanovenie teobromínu je možné použiť gravimetrickú metódu, ktorá je pre praktické účely vyhovujúca.

Pre exaktnejšie výsledky uvedených alkaloidov — najmä ak ide o zmesi — musí sa použiť chromatografické rozdelenie.

Literatúra

- [1] MELICHAR, B., a i.: Chemická léčiva, Avicenum, Praha 1972
- [2] PRÍBELA, A., TOMÁŠEK, K.: Zborník s konferencie o nealkoholických nápojoch, Dom techniky, Košice 1977
- [3] NOIJENS, J. M., VELDEN, H.: Z. Lebensmitt. Untersuch. u. Forsch. 153, 1973, s. 97
- [4] PN - GRT - Pivovary a sladovne, Praha 1974
- [5] GILS, W. F., HIDSKE, G. G.: Z. Lebensmitt. Untersuch. u. Forsch. 148, 1972, s. 89
- [6] HADORN, H., ZÜRCHER, K.: Mitt. Lebensm. Hyg. 55, 1964, s. 194
- [7] HEY, H.: Z. Lebensmitt. Untersuch. u. Forsch. 148, 1972, s. 1
- [8] BELJAARS, P. R., KOKEN, P. J.: J. ass. off. analyt. chem. 56, 1973, s. 1284
- [9] BÄRWALD, G., PRUCHA, J.: Mineralwasser Z., 26, 1973, s. 859
- [10] BANDION, F.: Mitt. Rebe u. Wein, 25, 1975, s. 107
- [11] WISNIEWSKI, J. V.: Helwett - Pacard applic. labor. report, 1001, 1965
- [12] RUICK, G.: Lebensm. Ind. 23, 1976, s. 131
- [13] HADORN, H., ZÜRCHER, K.: Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 56, 1965, s. 491
- [14] NEWTON, J. M.: J. ass. off. analyt. chem. 52, 1969, s. 1133
- [15] LEHMANN, G., MORÁN, M.: Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch. 147, 1971, s. 281
- [16] LUCCI, A., FERRAMONDO, A.: cit. Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch. 152, 1973, s. 217
- [17] ČSN 58 0240 ÚNM, Praha 1964
- [18] JAYRAMAN, K. S., RAMENJAM, S.: Indian. J. Technol. 3, 1965, s. 337
- [19] MEDOVARSKÁ, B.: Diplomová práca, ČHTF, SVŠT, Bratislava 1976
- [20] LEHMANN, G., NEUMANN, B.: Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch. 153, 1973, s. 363
- [21] Čs. lékopis, Avicenum, Praha, 1970
- [22] ČSN 58 0113 UNM, Praha 1970
- [23] FRISCHKORN, C. G. B.: Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. 150, 1975, s. 295
- [24] BALTES, W.: Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. 152, 1973, s. 145
- [25] WITZTHUM, O. G. a i.: Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. 154, 1974, s. 135
- [26] BALTES, W., KLASSMANN, M.: Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. 153, 1973, s. 379
- [27] FRANZKE, G. a i.: Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. 139, 1969, s. 85
- [28] NOVÁKOVÁ, S.: Diplomová práca, ČHTF, SVŠT, Bratislava, 1975

Príbelá, A. - Tomášek, K. - Medovarská, B.: Stanovenie chinínu a kofeínu v nealkoholických nápojoch. Kvas. prům. 24, 1978, č. 6, s. 135—137.

Podľa štatistického zhodnotenia je pre rutinnú kontrolu obsahu chinínu najvhodnejšia metóda fluorometrická, ktorá je veľmi citlivá, relatívne špecifická, dostatoč-

ne presná a veľmi rýchla. Pre stanovenie kofeínu je vhodná titračná metóda, pomerne presná a časovo menej náročná ako metóda fotometrická. Pre stanovenie teobromínu je použiteľná gravimetrická metóda.

K získaniu exaktných výsledkov je nutné chromatografické rozdelenie.

Прибела, А. — Томашек, К. — Медоварска, Б.: Определение содержания хинина и кофеина в безалкогольных напитках. Квас. прум. 24, 1978 № 6, стр. 135—137.

Статистические данные показывают, что для контрольного определения содержания хинина в безалкогольных напитках следует в производственных условиях пользоваться флуорометрическим методом. Этот метод отличается высокой чувствительностью, дает достаточно точную информацию и экономит время. Для определения кофеина рекомендуется отдавать предпочтение титрованию. Анализ занимает меньше времени чем фотометрическое определение, обеспечивая одновременно достоверные данные. Теобромин определяется лучше всего с помощью всего анализа. Совершенно точные результаты может, однако, дать лишь разделительная хроматография.

Príbelá, A. - Tomášek, K. - Medovarská, B.: Determination of Quinine and Caffeine in Non-alcoholic Beverages. Kvas. prům., 24, 1978, No. 6, pp. 135—137.

Statistical investigations confirm, that for routine determination of quinine, present in non-alcoholic beverages, the fluorometric method can be recommended as a very sensitive and specific one, giving reasonably accurate results and requiring little time. As far as the determination of caffeine is concerned, titration should be preferred to photometric method, since it provides more reliable data and saves time. Theobromine can be best determined by applying a gravimetric method. For exact results, it is, of course, necessary to use partition chromatography.

Príbelá, A. - Tomášek, K. - Medovarská, B.: Bestimmung des Chinin- und Koffeingehalts in alkoholfreien Getränken. Kvas. prům., 24, 1978, No. 6, S. 135—137.

Nach der statistischen Auswertung eignet sich für die Routinkontrolle des Chiningehalts am besten die fluorimetrische Methode, die sehr empfindlich, relativ spezifisch, genügend genau und sehr schnell ist. Für die Koffeinbestimmung ist die Titrationsmethode geeignet, denn sie ist verhältnismäßig genau und im Vergleich mit der photometrischen Methode weniger zeitraubend. Für die Bestimmung des Teobromins wird die gravimetrische Methode empfohlen. Für Erzielung exakter Ergebnisse ist die chromatographische Trennung notwendig.