



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo in  
kemijsko tehnologijo

Mednarodno leto kemije

60. obletnica Slovenskega kemijskega društva

# Slovenski kemijski dnevi 2011

Zbornik povzetkov referatov



Slovensko kemijsko društvo

Portorož, september 2011

## DOLOČANJE KOFEINA V PODZEMNI VODI Z UPORABO EKSTRAKCIJE NA TRDNO FAZO IN PLINSKE KROMATOGRAFIJE Z MASNO SPEKTROMETRIJO

### DETERMINATION OF CAFFEINE IN GROUNDWATER BY SOLID-PHASE EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY

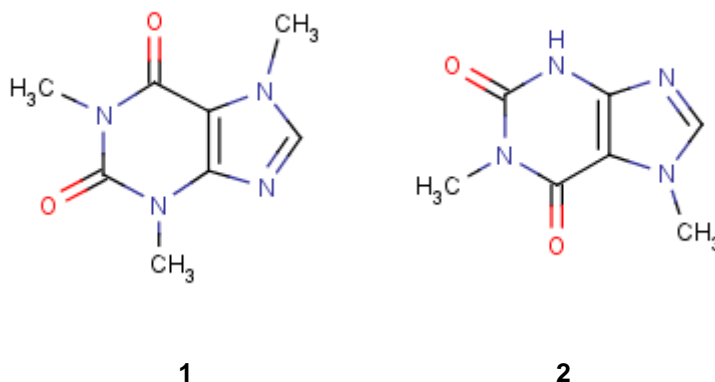
Primož Auersperger, Karin Lah, Vlasta Kramarič Zidar  
Javno podjetje Vodovod-Kanalizacija d.o.o., Vodovodna cesta 90, 1000 Ljubljana,  
primoz.auersperger@vo-ka.si

**Povzetek.** Predstavljena je analizna metoda za določanja kofeina z ekstrakcije na trdno fazo (SPE) in plinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (GC-MS) z uporabo internega standarda. Ker je raba kofeina zelo razširjena, lahko služi za indikator antropogenega onesnaževanja vodonosnikov. Kofein je vodotopna spojina s precej kratko razpolovno dobo v naravnih vodah. Razpolovna doba znaša od 24 ur do nekaj dni. Zaradi navedenega je spojina dober pokazatelj »hitrih« poti dotoka onesnaženj antropogenega izvora. Za določanje se največkrat uporabljajo metode tekočinske kromatografije, mogoče pa ga je določati tudi z GC-MS. V slednjem primeru je za doseganje večje natančnosti in točnosti smiselno uporabiti metodo internega standarda. Razvoj analizne metode za določanje kofeina je potekal po akreditirani metodi z delno fleksibilnim obsegom po prilogi akreditacijske listine LP-023.

**Ključne besede:** SPE, GC-MS, kofein, podzemna voda, interni standard.

#### Uvod

Kofein (1,3,7-trimetilksantin) je eno od zelo pogostih poživil, čigar raba je razširjena po vsem svetu. Kofein je naravni alkaloid in sestavina številnih napitkov, uporablja pa se tudi v terapevtske namene. V prsti in vodonosniku je dobro mobilni zaradi visoke vodotopnosti ( $\log K_{ow} -0.07$ )<sup>1</sup>. Kofein je dobro biološko razgradljiv. V obremenjenih površinskih vodah je njegova razpolovna doba lahko krajša od 24 ur<sup>1-3</sup>. Najpomembnejši metabolni produkt kofeina je 1,7-dimetilksantin. Spremljajoča metabolna produkta sta 3,7-dimetilksantin in 1,3-dimetilksantin. Dimetilksantini se razgradijo v monometilksantine in naprej do metil sečne kisline<sup>1</sup>. Dimetilksantini se nahajajo tudi v produktih splošne rabe.



Slika 1. Kofein (levo) in 1,7-dimetilksantin.

Zaradi dobre mobilnosti v vodonosniku in hkrati dobre biorazgradljivosti, je lahko kofein indikator »hitrih« poti za onesnaženja urbanega izvora. Za določanje kofeina obstojijo številne publicirane metode, ki temeljijo na osnovi tekočinske ali plinske kromatografije, največkrat sklopljene z masno spektrometrijo<sup>4</sup>. Pri analiznih metodah s področja plinske kromatografije je potrebno za doseganje večje točnosti rezultatov uporabiti primeren interni standard (IS). Posebno pozornost pri analizi kofeina je potrebno nameniti izogibanju sekundarni kontaminaciji vzorcev.

V prispevku bo predstavljena GC-MS analizna metoda za določanje kofeina z metodo internega standarda. Prikazana bo njena uporabnost na realnih primerih.

## Eksperimentalno delo

### Materiali

Plinski kromatograf z masnim spektrometrom 17A/QP 5050A GC-MS z avtomatskim podajalnikom AOC 20i, Shimadzu, Japonska; silanizirani linerji, SGE, Avstralija; DB 5MS kolona, 30 m x 0,25 mm *I.D.*, *df* 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent (J&W Scientific), ZDA; PC z Solutions programsko opremo, Shimadzu, Japonska in NIST 2008, ZDA ter PMW TOX, Nemčija knjižnicami masnih spektrov; 1 L Duran rjave vzorčevalne steklenice, Schott, Nemčija. SPE vakuumska enota za 12 vzorcev, Alltech, ZDA; SPE kolone LiChrolut EN 200 mg, Merck, Nemčija; helij, 99,9999% in dušik 99,999%, Messer, Slovenija; aceton, metanol, etilacetat in diklorometan (DCM) za GC-MS analizo, Rathburn, Škotska; izvirska voda brez prisotnih analitov; ultra čista voda (upw) - Easypure LF, Barnstead/Thermolyne International, ZDA. Heksaklorobenzen (HCB), trden, p.a., Fluka, Švica; referenčni material - kofein, Dr. Ehrenstorfer, Nemčija; interni standard – kofein-D9 (1,3,7-trimetil-D9), C/D/N ISOTOPES, Kanada.

### Postopek

Postopek za pripravo standardnih raztopin, SPE in GC-MS smo publicirali drugje<sup>5</sup>. Za določanje koncentracije kofeina je bila uporabljena modificirana EPA 525.2 metoda, ki temelji na ekstrakciji na trdno fazo (SPE) in uporabi plinske kromatografije z masno spektrometrijo (GC-MS). Modifikacija EPA 525.2 metode je omogočila določanje kofeina do koncentracije nekaj ng/L. Analizna metoda ima akreditiran status skladno s standardom SIST EN ISO/IEC 17025. Za kvantitativno določitev kofeina z GC-MS se je uporabil devterirani interni standard kofein-D9.

Steklovino, ki se uporablja za vzorčenje in pripravo vzorcev v laboratoriju je potrebno temeljito čistiti. Pri čiščenju se uporablja splakovanje z acetonom HPLC čistoče in segrevanje na 270°C od 40 do 60 minut. Volumetrične steklovine se ne segreva, ampak se jo splakne z acetonom in suši pri max. temperaturi 180°C.

Pri vzorčenju in pri analizi vzorcev v laboratoriju se je potrebno izogibati vsem pripravkom, ki vsebujejo kofein. Dodatek devteriranega kofeina je potrebno izvesti v čim krajšem času po odvzemu vzorca in opraviti ekstrakcijo v 24 urah po odvzemu.

Za predkoncentriranje vzorcev s SPE se uporablja vakuumska enota z 12 nastavki in ustrezne PTFE cevke za sesanje vzorcev iz steklenic za vzorčenje skozi SPE kolono. Za volumetrične odmerke se uporablja mikrobrižge različnih volumnov.

Pred analizo vzorcev se izvede kontrola občutljivosti sistema z injiciranjem 1  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{g/L}$  raztopine heksaklorobenzena v diklorometanu in kontrola čistosti sistema z injiciranjem 1  $\mu\text{L}$  raztopine 5 mg/L endrina in p,p-DDT v acetonu.

Sistem se krmili z osebim računalnikom s Solutions računalniškim programom (Shimadzu, Japonska).

Uporablja se temperaturni program od začetne temperature kolone 50°C (1 min) do 270°C, s skupnim časom analize 45 min in začetnim hitrim segrevanjem. Temperatura injektorja je 280°C in detektorja 300°C.

Kalibracija se izvede s tritočkovno kalibracijo po načinu celotne procedure, ki vključuje tudi SPE. Na ta način se izdelava umeritvena krivulja iz razmerij med površinama analita in internega standarda ( $A/A_{I,S}$ ), proti razmerjem med maso analita in internega standarda ( $m/m_{I,S}$ ). Umeritveno krivuljo uporabljamo za računanje koncentracije analitov v vzorcih v območju tekoče kalibracije. V območju med LOD in spodnjo mejo kalibracije uporabljamo za izračun koncentracije razmerje občutljivosti (RRF). Primer kalibracije in kontrole je prikazan v Tabeli 1.

Tabela 1: Prikaz načina kalibracije po načinu celotne in kontrole za kofein, b (naklon)= 1,258, a (preseka) = -0,0314.  $\gamma$  - masna koncentracija, ng/L,  $\mu$  – dodani kofein »prava vrednost«.

Kalibracija; $A_{CAF}/A_{I.S.}$ (slepa) = 0,0262		
$m_{CAF}$ , ng	$m_{CAF}/m_{I.S.}$	$A_{CAF}/A_{I.S.} - A_{CAF}/A_{I.S.}$ (slepa)
40	0,4	0,4264
100	1,0	1,0338
200	2,0	2,0979
Kontrola <sup>a</sup>		
$A_{CAF}/A_{I.S.} - A_{CAF}/A_{I.S.}$ (slepa)	$\gamma$ , ng	$\mu$ , ng
0,2133	20	20,42

<sup>a</sup>Za kalibracijo in kontrolo uporabljamo dve neodvisno pripravljene standardni raztopini. Za izračun rezultatov v območju kalibracije uporabljamo enačbo umeritvene krivulje 1. reda, izračunane z linearno regresijo:

$$\gamma_{CAF} = ((A/A_{I.S.} - A/A_{I.S.}(\text{slepa})) - a) * m_{I.S.} / (V_{\text{vzorca}} * b).$$

**3**

Kjer je rezultat za kontrolni vzorec pod spodnjo mejo kalibracije, uporabljamo pri izračunu razmerje občutljivosti (RRF) med analitom in I.S. na spodnji meji kalibracije:

$$\text{RRF (40 ng)} = (A_{CAF}/A_{I.S.} - A/A_{I.S.}(\text{slepa})) / (m_{CAF} / m_{I.S.}), \text{ kjer je } m_{I.S.} = 100 \text{ ng.}$$

**4**

$$\gamma_{CAF} = (A/A_{I.S.}) * m_{I.S.} / (V_{\text{vzorca}} * \text{RRF}), \text{ kjer je } V_{\text{vzorca}} = 1,10746 \text{ L}$$

**5**

Kalibracijo izvajamo na enak način kot preskušanje realnih vzorcev. Za kontrolo kalibracije pripravljamo kontrolne vzorce z dodatkom raztopin v vodo z naravnim organskim ozadjem ("izvirna voda"). Raztopine za kontrolne vzorce pripravljamo neodvisno od vzorcev za kalibracijo. Večino kontrolnih vzorcev pripravljamo v intervalu med LOQ in spodnjo mejo tekoče kalibracije. Občasno se pripravljajo tudi kontrolni vzorci s koncentracijo 0 (slepe vrednosti). Za slepo vrednost serije  $A/A_{I.S.}$  (slepa) vzorcev se uporabi najnižje ugotovljeno razmerje pri vzorcih v primeru, ko so prisotni vzorci, kjer je prisotnost kofeina malo verjetna. V nasprotnem primeru se za slepo vrednost serije uporabi kontrolni vzorec s koncentracijo 0, če pa te kontrole ni bilo pa slepe vrednosti predhodne serije ali vzorec, kjer se kofeina ne pričakuje.

## Rezultati

Za razliko od analitov iz skupine pesticidov in njihovih razgradnih produktov, ki se jih poleg kofeina določa po opisani analizi metodi, je bilo potrebno pri analizi kofeina uvesti večji nadzor nad sekundarno kontaminacijo vzorcev pri vzorčenju in pri pripravi vzorca v laboratoriju. Pri začetni vpeljavi se je zaradi velike verjetnosti sekundarne kontaminacije vzorcev namesto LOD vpeljala meja poročanja 10 ng/L na območju, kjer je bil vpliv sekundarne kontaminacije še zanemarljiv. Po preučitvi mogočih ukrepov za omejitev sekundarne kontaminacije se je uspelo določiti tudi nižje vrednosti.

Vzorčevalci in tehnično osebje za pripravo vzorcev na dan vzorčenja oz. analize niso smeli uživati kave in drugih pripravkov, ki vsebujejo kofein (Tabela 2). Poleg tega ukrepa se je zmanjšal dodatek internega standarda. Po uvedbi teh ukrepov se je doseglo mejo zaznavanja (LOD) 2,0 ng/L in mejo določanja (LOQ) pri 6,7 ng/L.

Tabela 2: LOD iz trikratnika kombiniranega standardnega odmika vzorcev brez dodanega kofeina - 4 slepe v šestih neodvisnih serijah.

	$A_{CAF}/A_{I.S.}$ (slepa) povp (N=24)	s (kombiniran)	LOD, ng
pred modifikacijo	0,020421	0,01922	4,88
po modifikaciji	0,02774	0,01559	1,42

Pri meji določanja se je dosegala razširjena merilna negotovost  $U(k=2)$  20%. Model koncentracijske odvisnosti razširjene merilne negotovosti je podan kot:

$$U(k=2) = 2 \cdot (0,05 \cdot \gamma_x + 0,17 \cdot \text{LOD}); \text{ pri čemer je } \gamma_x \text{ koncentracija kofeina v vzorcu.}$$

## 6

Po vpeljavi analizne metode smo izvedli študij robustnosti SPE faze analize, pri katerem smo spreminjali parametre, ki vplivajo na izkoristek ekstrakcije in uvajali odstopanja od pravilne izvedbe procedure.

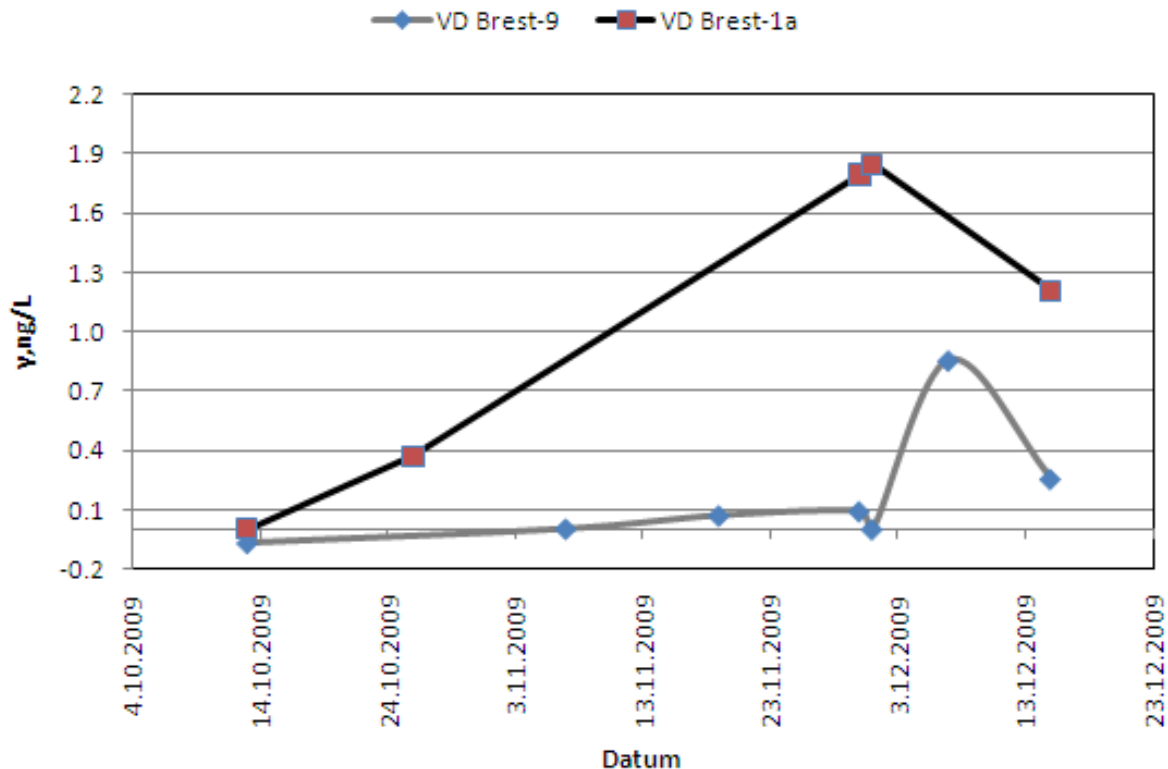
Tabela 3: študij robustnosti, analiza pripravljenih vzorcev z 200 ng kofeina po LGC/VAM/1998/088, Protocol for uncertainty evaluation from validation data, stran 27.

Postopek	Oznaka	Pravilen postopek	Napačen postopek
Kondicioniranje SPE kolon	A	10 mL metanola	1 mL metanola
Spiranje kolon	B	10 mL DCM, 10 mL acetona	brez spiranja
SPE kolona se po aktiviranju posuši	C	NE	DA
Dodatek metanola	D	20 mL	0 mL
Eluiranje	E	10 mL DCM	1 mL DCM
Sušenje SPE kolon	F	brez sušenja	1 uro
Sušenje ekstrakta z N2	G	do suhega	do suhega plus 1 uro

	A	B	C	D	E	F	G
$D_x$	<b>2,17</b>	-0,73	-0,12	0,94	-0,86	-0,18	<b>-2,38</b>
$t_{exp}$	<b>3,34</b>	1,13	0,18	1,45	1,32	0,28	<b>3,67</b>
Ugotovitev	<b>VPLIV</b>	NI VPLIVA	NI VPLIVA	NI VPLIVA	NI VPLIVA	NI VPLIVA	<b>VPLIV</b>

Ugotovilo se je, da je SPE ekstrakcija vodnih raztopin kofeina z dodatkom internega standarda zelo robustna. Edina ugotovljena vpliva sta bila volumen metanola, uporabljenega pri aktivaciji in čas sušenja kolon po izvedeni SPE.

V nadaljevanju podajamo dva primera praktične rabe metode pri študiju dogajanj v različnih vodonosnikih.



Slika 2: časovna vrsta rezultatov analiz vzorca za vodnjaka VD Brest-1a in VD Brest-9, kjer kofeina ni pričakovati.

Iz Slike 2 je razvidno, da ne moremo povsem izključiti dotoka sledov kofeina v VD Brest-1a, kljub temu, da je bila najvišja izmerjena koncentracija nižja od validirane LOD 2,0 ng/L.

Tabela 4: koncentracija kofeina v reki Reki in izviru reke Timave na italijanski strani.

Datum	$\gamma$ (reka Reka), ng/L	Pretok (reka Reka), m <sup>3</sup> /s	$\gamma$ (Timava-2), ng/L	Pretok (Timava-2), m <sup>3</sup> /s
3.12.2008	28	35,9	<10 (0)	84
9.12.2008	82	13,7	27	85

Voda iz reke Reke potrebuje v času visokih vod za pot od ponora v Škocjanskih jamah do izvirov Timave nekaj dni<sup>6</sup>, kljub kratkemu transportnemu času pa je iz Tabele 4 razviden vpliv razgradnje kofeina in mešanja reke Reke z vodami, ki so s kofeinom manj obremenjene. Natančnejša študija porazdelitve kofeina v kombinaciji s katerim od stabilnejših organskih onesnaževal (npr. zdravilom karbamazepinom), bi dala pomembne dodatne informacije o zapletenem dogajanju v kraškem vodonosniku.

## Zaključek

Pri določanju kofeina je zelo pomemben nadzor nad sekundarno kontaminacijo vzorcev tako pri vzorčenju, kot pri analizi v laboratoriju. Devteriran kofein se je izkazal kot odličen interni standard, kar je posebej dobro razvidno iz eksperimentov robustnosti. Zaradi razgradljivosti je potrebno izvesti dodatek internega standarda in ekstrakcijo na trdno fazo v najkrajšem možnem času po vzorčenju.

Določitev koncentracije kofeina v vodonosniku da pomembne informacije o mogočih virih vnosa onesnaževal antropogenega izvora. Prisotnost kofeina je indikacija »hitrejših« poti za onesnaževala v vodonosniku in indikacija akutnih onesnaževanj v neposredni bližini. Posebej dobro je to razvidno pri spremljanju koncentracije kofeina v vodonosnikih, pri katerih se zaradi različne geološke zgradbe mobilnost onesnaževal razlikuje (npr. kraško-razpoklinski vodonosniki, aluvialni vodonosniki).

*Delo je omogočilo Javno podjetje Vodovod–Kanalizacija d.o.o., ki se mu avtorji zahvaljujemo, posebno direktorju družbe Krištofu Mlakarju in direktorju tehnično – investicijskega sektorja Jožetu Bogolinu. Zahvaljujemo se tudi sodelavcem iz Razvojne službe Borisu Vidicu in Juretu Virantu ter sodelavcem Sanitarne službe Marjetki Žitnik, Mojci Rupar, Marjanu Čudnu in Mihi Kozjeku za sodelovanje pri vzorčenju.*

### Reference

1. Internetna baza U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, and National Institutes of Health, Department of Health & Human Services, 2011 na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/>.
2. B.Jamnik, P.Auersperger, J.Urbanc, K.Lah, J.Prestor, *Geologija*, 52 (2), **2009**, 241-248.
3. I.J. Buerge, T. Poiger, M.D. Muller, H.R.Buser, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (4), **2003**, 691-700.
4. T.Reemtsma, J.B. Quintana, *Analytical Methods for Polar Pollutants in: ed. by T.Reemtsma, M.Jekel, Organic Pollutants in the Water Cycle: Properties, Occurrence, Analysis and Environmental Relevance of Polar Compounds, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2006.*
5. P.Auersperger, J.Kus, K.Lah, J.Marsel, *J. Chromatogr. A*, 1088, **2005**, 234-241.
6. F.Cucchi,L.Zini, *Acta Carsologica*, 31/1, **2002**, 75-84.

### Abstract

Presented is an analytical method for determination of caffeine by solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) using internal standard. Due to its widespread use, caffeine is a potential tracer of urban wastewater intrusion in aquifers. It is a water-soluble and readily degradable compound. In natural waters it has a half-life of about 24 hours up to a few days. Accordingly it could be an appropriate tracer especially for critical points of intrusion of urban wastewater in aquifers. Analytical methods for caffeine determination are usually based on liquid chromatography, but its determination is also possible by GC-MS. In case of analysis by GC-MS, the use of an internal standard is strongly advisable. The presented method for caffeine determination was developed according to the accredited method with a partially flexible scope according to the annex of the ISO 17025 accreditation certificate LP-023.

**Key words:** SPE, GC-MS, caffeine, groundwater, internal standard.