

**PRÀCTICA H. CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC) (II):**  
**DETERMINACIÓ DE CAFEÏNA EN CAFÈ SOLUBLE**

**1. INTRODUCCIÓ**

L'HPLC, és una tècnica que s'utilitza per separar i quantificar compostos en mostres líquides. En aquesta pràctica, s'utilitzarà per identificar el contingut de cafeïna en els patrons i així poder preparar una recta de calibratge, mitjançant les àrees.

En tenir la recta de calibratge, quantificarem el contingut de cafeïna en una mostra de cafè soluble normal i una mostra de cafè soluble descafeïnat i l'interpolarem a la recta, per obtenir la quantitat de cafeïna de les mostres.

**2. OBJECTIUS**

L'objectiu principal és aprendre a utilitzar un cromatògraf d'HPLC i saber determinar el contingut de cafeïna en mostres de cafè, mitjançant una interpolació en una recta de calibratge. Després de determinar el contingut de cafeïna, s'haurà de verificar que ambdues mostres compleixen la normativa legal.

Pel cromatògraf d'HPLC, s'ha de preparar i filtrar la fase mòbil, per eliminar totes les partícules que puguin provocar l'obturació de la columna. Finalment, s'haurà d'entendre l'ús de tampons de pH en la fase mòbil.

**3. DESCRIPCIÓ DE LA MOSTRA**

En aquesta pràctica, hi ha dues mostres, de color marró, una de cafè solubles cafeïnat i l'altre de cafè soluble descafeïnat. Ambdós cafès són de la marca "Nescafé" i presenten el següent número de lot:

- Cafè cafeïnat: L82640289R1
- Cafè descafeïnat: L10810289R2

**4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL**

- Instrumentació

L'equip utilitzat, és un HPLC Shimadzu, amb una columna de 200x4,6mm. La columna és de fase inversa (C<sub>18</sub>) i el volum màxim d'injecció, és de 20µL. El detector treballa a una longitud d'ona de 272nm i el cabal és de 1ml/min.

El contingut de la fase mòbil és: àcid acètic 0,1M (8%), acetat de sodi 0,1M (12%), aigua MilliQ (40%) i metanol (40%). És necessari utilitzar un tampó d'àcid acètic/acetat per mantenir el pH al voltant de 5, ja que la cafeïna pot actuar com una base feble (presenta una amina terciària). Mantenint aquest valor de pH s'aconsegueix que la cafeïna mantingui la seva forma neutra.

La fase mòbil s'ha de filtrar a través d'una membrana de mida de porus adient, màxim d'uns 0,45µm, i s'ha de desgasificar uns 5 minuts per eliminar tots els gasos dissolts. A part, també s'ha de filtrar i desgasificar 500ml d'una dissolució d'aigua MilliQ i metanol, 90:10, per rentar l'equip d'HPLC.

- Preparació de la recta de calibratge

La recta de calibratge es prepara, fent patrons de diferents concentracions coneguda de cafeïna dissolta en aigua MilliQ.

Alba Pont Pujol NIU:1632201

David Selas Fernández NIU:1634270

Es prepara primer una solució de 1000ppm de cafeïna, pesant 100mg de cafeïna i amb un matras de 100ml, es dissoldran amb aigua MilliQ. **S'han pesat 0,1004 grams.** Es necessita una solució més diluida per preparar els patrons, per tant es prepara una de 100ppm a partir de la de 1000ppm.

$$100ml \times \frac{100mg}{1000ml} \times \frac{1000ml}{1000mg} = 10 ml$$

Dissoldrem 10ml de la solució de 1000ppm en 100ml d'aigua MilliQ.

A partir de la solució de 100ppm, es preparen els patrons per la recta de calibratge. Es dissolen diferents volums d'aquesta solució, en matrassos de 50ml, enrasant amb aigua MilliQ.

Volum afegit de la solució de 100ppm	Càlcul de la concentració	Concentració final en el matràs de 50ml
1ml	$100ppm \times \frac{1ml}{50ml} =$	2ppm
2ml	$100ppm \times \frac{2ml}{50ml} =$	4ppm
4ml	$100ppm \times \frac{4ml}{50ml} =$	8ppm
6ml	$100ppm \times \frac{6ml}{50ml} =$	12ppm
10ml	$100ppm \times \frac{10ml}{50ml} =$	20ppm

*Taula 1: concentració dels patrons*

- Preparació de la mostra

La mostra de cafè soluble cafeïnat, es prepara dissolent 100mg de cafè, en 100ml d'aigua MilliQ. **S'han pesat 0,1016 grams.**

En canvi la de cafè soluble descafeïnat, es prepara dissolent 250mg de cafè descafeïnat, en 100ml d'aigua MilliQ. **S'han pesat 0,2503 grams.**

Un cop s'han preparat tots els patrons i la mostra, s'ha de posar el cromatògraf en marxa. Primer s'ha de connectar i purgar el sistema de bombes i seleccionar les condicions de cabal adient, deixant circular la dissolució d'aigua MilliQ:metanol (90:10), durant uns 15 minuts per netejar el sistema.

A continuació, es prepara el mètode i es passa per la columna la fase mòbil per tal d'equilibrar-la, durant uns 20 minuts. Després d'estar estabilitzada, s'injecten els patrons, mitjançant un filtre a la xeringa. El cromatògraf, ens donarà un cromatograma, en el qual s'haurà d'identificar el pic de la cafeïna i quantificar l'àrea, per generar la corba de calibratge.

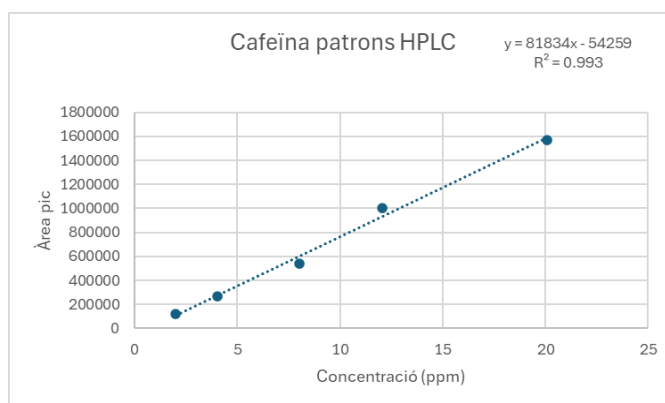
## 5. TRACTAMENT DE DADES

Després d'injectar els diferents patrons de cafeïna per la columna de l'HPLC s'han obtingut les següents àrees de pic:

Concentració(ppm)	Àrea
2.008	124377
4.016	265395
8.032	543732
12.048	1006390
20.08	1568214

*Taula 2: dades del calibrat (es mostren les concentracions reals, a partir de la cafeïna pesada al laboratori)*

si es grafiquen aquestes dades es pot apreciar que s'ajusten força bé a una recta:



*Figura 1: representació gràfica de les dades*

Amb la funció “ESTIMACIÓN LINEAL” de excel es troba la desviació estàndard dels residuals ( $Sy/x$ ):  $Sy/x = 57198.23132$ . A partir d'aquest valor i del de la desviació estàndard de la interpolació ( $So$ ) es pot obtenir l'interval de confiança de la concentració de cafeïna a les mostres:  $x \pm t \cdot s_o = x \pm I$ , on  $t$  és la  $t$  d'estudent per un interval de confiança del 95% i 3 graus de llibertat en aquest cas.

En el cas del cafè cafeïnat s'obté el següent interval de confiança:

ymitja	701621.6
sx	7.1840392
s^2x	51.610419
sxx	206.44168
so	0.7883197
t	3.182
I	2.5084334

*Taula 3: dades per determinar l'interval de confiança*

En el cas del cafè descafeïnat:

ymitja	701621.6
sx	7.1840392
s^2x	51.610419
sxx	206.44168
so	0.8192858
t	3.182
I	2.6069674

*Taula 4: dades per determinar l'interval de confiança*

## 6. RESULTATS

D'acord amb les àrees proporcionades en injectar cada mostra s'han obtingut els següents resultats interpolant els senyals a la recta:

Cafè cafeïnat:

Àrea pic	1017220
Concentració (ppm)	13.09
Cafè pesat (mg)	101.6
Volum dissolució (L)	0.25
Massa cafeïna (mg)	3.2725
%cafeïna	3.220964567

Taula 5: dades i resultats

Cafè descafeïnat:

Àrea pic	211240
Concentració (ppm)	3.244
Cafè pesat (mg)	250.3
Volum dissolució (L)	0.1
Massa cafeïna (mg)	0.3244
%cafeïna	0.129604475

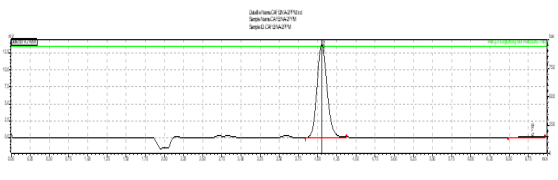
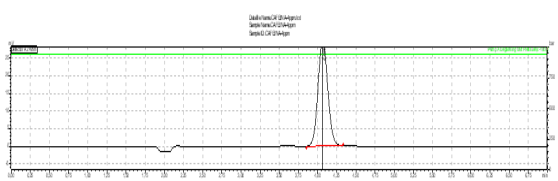
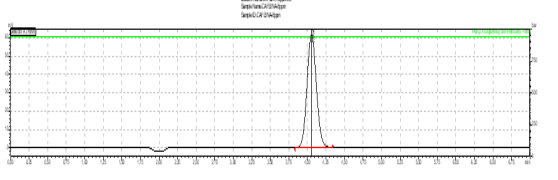
Taula 6: dades i resultats

Resultats finals:

Tipus de cafè	%cafeïna
Cafè cafeïnat	$3.2 \pm 0.6\%$
Cafè descafeïnat	$0.1 \pm 0.1\%$

Taula 7: resultats finals

A continuació es mostren els cromatogrames obtinguts per cada patró i mostra:

2.008 ppm	
4.016 ppm	
8.032 ppm	

12.048 ppm	
20.08 ppm	
Cafè cafeïnat	
Cafè descafeïnat	

A tots els patrons es pot veure que el temps de retenció de la cafeïna són aproximadament 4.05 minuts. A més a més, també s'aprecia un increment de l'àrea a mesura que augmenta la concentració.

Als pics de les mostres s'observa l'aparició de moltes altres substàncies, però es pot identificar la cafeïna, ja que es coneix el seu temps de retenció. El pic de la cafeïna és molt més distingible a la mostra de cafè cafeïnat a causa que la concentració de cafeïna és molt més gran que a la mostra de cafè descafeïnat, per tant, el pic també és més gran.

## 7. CONCLUSIÓ

Com a conclusió, la recta de calibratge amb patrons externs, ens permeten quantificar compostos de concentracions no conegudes. L'HPLC, permet separar anàlits a partir de la seva diferent interacció amb una fase estacionària apolar (en aquest cas), i mitjançant els temps de retenció es podran identificar i diferenciar diferents anàlits.

Segons la legislació vigent de la Comunitat Europea (Directiva 99/04/CE), el cafè descafeïnat soluble ha de contenir màxim un 0,3% en pes de cafeïna. En el nostre cas ens surt que conté un 0,1% de cafeïna, per tant, està dins del límit legal. D'altra banda, el cafè cafeïnat soluble, segons el Real Decret 1676/2012, del 14 de desembre, ha de contenir com a mínim un 0.7% de cafeïna, tenint en compte que la mostra està al voltant el 3%, aquest tipus de cafè també compleix amb la normativa.