

## PRÁCTICA 3: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CAFEÍNA EN UNA BEBIDA ENERGÉTICA POR HPLC A PARTIR DE UNA CURVA DE CALIBRACIÓN



### INTRODUCCIÓN

La cromatografía de líquidos es una técnica que permite separar físicamente, identificar y cuantificar los distintos componentes de una mezcla. La separación está basada en la distribución y afinidad de los componentes de la mezcla en dos fases una fija y otra móvil que se mueve a través de la fase fija.

La cafeína por ser un analito presente en bebidas de consumo rutinario, es un interesante ejemplo de identificación y cuantificación mediante ésta técnica de separación.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) ha propuesto una definición para cromatografía: "cromatografía es un método físico de separación, en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una estacionaria (fase estacionaria) y otra que se mueve (fase móvil). La fase móvil es una sustancia líquida que tiene la función de ser el acarreador y diluyente de los analitos que se van a analizar, la muestra, soluto o analito, es el compuesto o mezcla de compuestos que se desean separar y analizar y la fase estacionaria es el material que contiene la columna, en donde, gracias a su forma geométrica, grupo funcional, tamaño e interacciones con el analito en la fase móvil se lleva a cabo la separación de los analitos.

La cromatografía de líquidos comprende técnicas como la de exclusión molecular (separación basada en el tamaño molecular), de intercambio iónico (separación basada en cargas eléctricas), de reparto (reparto y/o adsorción entre las fases móviles). La cromatografía de reparto se subdivide en cromatografía en fase normal y fase reversa. En la cromatografía en fase normal, la fase estacionaria es polar y los compuestos menos polares eluyen primero. En la cromatografía en fase reversa, la fase estacionaria es no polar y los el compuesto compuestos más polares eluyen primero.

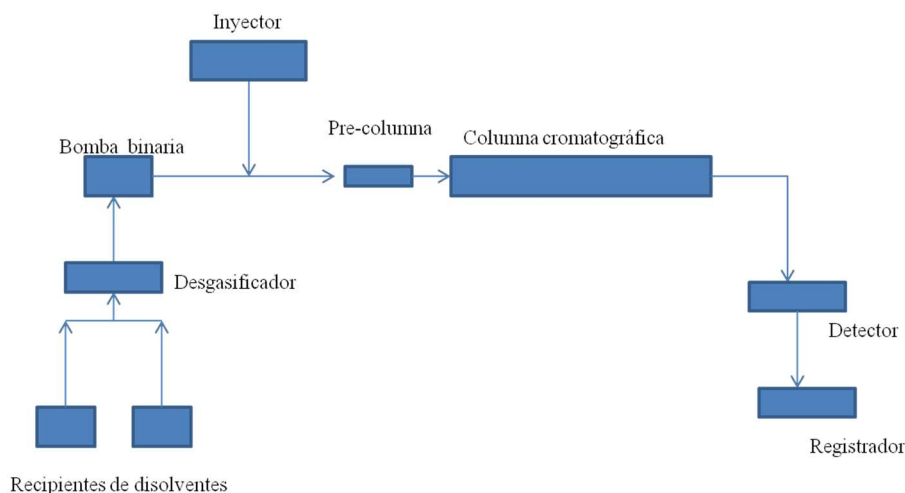
Los mecanismos de separación de los componentes de una muestra problema se basan en establecer un equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil. Cuánto más interactúe con la fase estacionaria, más lentamente se moverá a través de la columna. El equilibrio de distribución se define con la constante de distribución:

$$K_c = \frac{[X]_s}{[X]_m}$$

donde  $[X]_s$  es la concentración del componente X sobre o en la fase estacionaria, y  $[X]_m$  es la concentración en la fase móvil. Esta constante de equilibrio está gobernada por la temperatura, clase de compuesto y las fases estacionaria y móvil. Los solutos con un valor grande de  $K_c$  serán retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria que los que tienen un valor pequeño. Como resultado, estos últimos avanzarán (eluirán) por la columna con mayor rapidez (Harris y col., 2001).

## Equipo para HPLC

En la figura 1 se muestran los componentes básicos de HPLC y se pueden agrupar en cuatro partes principales (Christian 2009).



**Figura 1.** Componentes básicos de un HPLC.

### 1.- Suministro de la fase móvil.

La fase móvil consiste generalmente de más de un eluyente por lo que se requiere de varios depósitos del eluyente. El suministro de la fase móvil requiere de una bomba para llegar a las altas presiones que se requieren, pudiendo el sistema de bombeo producir un gradiente de elución (es decir cambiar concentraciones del eluyente); requiere de un desgasificador que tiene la función de eliminar la formación de burbujas que afectan el correcto funcionamiento de las bombas ocasionando grandes fluctuaciones de las caídas de presión, además de generar máximos falsos cuando llegan a pasar por el detector.

### 2.- Sistema de inyección de la muestra.

Las muestras pueden ser introducidas de forma manual con una jeringa que una válvula de muestreo (loop), actualmente se usan de manera sistemática válvulas automáticas de muestreo en la que las muestras se toman con un muestreador automático y su operación no requiere atención.

### 3. Columna.

Las columnas para HPLC se construyen con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme y una longitud entre 10 y 30cm. Los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10  $\mu\text{m}$ . Los materiales de los rellenos generalmente son de sílice, alúmina o resinas de intercambio iónico, pudiendo estar éstos recubiertos con polímeros (Skoog y col. 1999).

### 4. Detector.

Los detectores en HPLC son de dos tipos básicamente:

- 1) Los detectores basados en una propiedad de la disolución que responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifican por la presencia de los analitos y
- 2) Los detectores basados en una propiedad del soluto como la absorbancia UV, fluorescencia o intensidad de difusión que no son propias de la fase móvil. La detección más común es por absorción ultravioleta, la detección por índice de refracción es más universal pero menos sensible.

### **Análisis cualitativo y cuantitativo del analito.**

Los componentes de una muestra normalmente suelen identificarse a través del tiempo de retención en el cual eluyen los componentes del sistema cromatográfico. Este tiempo puede localizarse gráficamente a través del pico cromatográfico que es representado por una función Gaussiana, sobre la distribución de las moléculas que eluyen a lo largo del tiempo. La cuantificación del pico, representada como el área, conlleva la evaluación del número de moléculas de cada soluto (cada pico) y por tanto, la cantidad o concentración de la misma. El análisis cuantitativo se basa en la comparación de la altura, o el área, del pico del analito con la de uno o más patrones inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas.

### **OBJETIVO**

Que el alumno aprenda a operar un HPLC para su uso en la identificación y cuantificación de cafeína en bebidas energizantes.

### **MATERIALES Y REACTIVOS**

Vasos de precipitados de 250 y 500 ml

Pipetas volumétricas de 5 ml

Probeta de 100 ml

Parrilla con agitación magnética

Matraces volumétricos de 100 ml

Potenciómetro

Bomba de vacío y Matraz Kitasatos

Solución reguladora pH 4 y 7.

Jeringa de 5 ml con soporte para membranas de 0,45 ó 0,22  $\mu\text{m}$

Filtros de nylon de 0,45 ó 0,22  $\mu\text{m}$

Cafeína y Metanol grado HPLC

Buffer de fosfatos 0.025M pH 3

Columna analítica C18.

### **PROCEDIMIENTO**

#### **Preparación del equipo y acondicionamiento de la columna.**

Preparar una serie de soluciones de cafeína, se recomiendan concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L. Las fases móviles y la muestra a analizar deben ser filtrados en membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , para evitar que impurezas entren y contaminen la columna. En caso de que la muestra sea una bebida gaseosa, ésta deberá ser sometida a ultrasonidos previamente durante media hora con el fin de desgasificarla.

Colocar la columna dentro del horno de calentamiento, orientada de tal modo que la dirección del flujo de hacia el operador (todas las columnas tienen una flecha que indican el sentido del flujo de la fase móvil). Ajustar el flujo de la columna empleando los botones del panel de control. El flujo a través de la columna se deberá aumentarse lentamente, se recomienda hacerlo en intervalos de 0.1ml/min cada 3 minutos hasta alcanzar el flujo deseado.

Una vez alcanzado, dejar acondicionando la columna hasta que la presión permanezca constante (aprox. una hora). Una vez preparado el equipo, inyectar 20  $\mu\text{l}$  de cada solución patrón y determinar el área bajo la curva del pico de cafeína. Realizar por duplicado. Inyectar la muestra problema. Realizar por duplicado.

Una vez concluido el análisis, tanto la columna como el equipo de HPLC deberán ser enjuagados con la fase recomendada para su almacenamiento. Para la columna C18 se recomienda emplear pasar una mezcla de acetonitrilo-agua en proporción 65:35 a un flujo de 1 ml/min por 30 minutos.

### **CÁLCULOS EXPERIMENTALES.**

1. Determinar el tiempo de retención del pico de cafeína presente en la solución estándar.
2. A partir del área bajo la curva y las concentraciones empleadas, construir la curva patrón y por interpolación determinar la concentración de cafeína de la muestra problema y compararla con la reportada en la literatura.
3. Reportar el coeficiente de correlación de la curva patrón.

### **CUESTIONARIO**

1. Define tiempo de retención, estándar externo, separación isocrática y separación por gradiente.
2. ¿Qué cuidados debe practicarse en la operación de HPLC para favorecer la vida útil de una columna?
3. Menciona ¿Cuál es la influencia de la fase móvil en HPLC y cuál en CG?
4. ¿Cuál es la diferencia entre fase reversa y fase normal?

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Harris D. C., 2001. *Análisis Químico Cuantitativo*. 2ª edición. Editorial Reverté, S.A.
2. Skoog D. A., Leary J.J 1994. *Análisis Instrumental*. 4ª edición. McGRAW-HILL.
3. Christian G. D. 2009. *Química Analítica*. 6ª edición. McGRAW-HILL.