

## Practica 5 y 6

- **FAMILIARIZACIÓN CON EL HPLC MARCA WATERS**
- **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CAFEÍNA EN UNA BEBIDA ENERGÉTICA POR CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS (HPLC) A PARTIR DE UNA CURVA DE CALIBRACIÓN**

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.

### Objetivo general

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

### Objetivos particulares

- a) Identificar la presencia de cafeína a partir de su espectro de absorción y del tiempo de residencia.
- b) Preparar y obtener la curva de calibración de cafeína.

### Materiales

- 2 Jeringas de 5 ml
- Filtros de nylon de 0,45 ó 0,22  $\mu\text{m}$
- Cafeína grado HPLC (Provista por el profesor)
- 500 ml de Buffer de fosfatos 0.025M pH 3. Preparar por equipo.
- 500 ml de Metanol grado HPLC filtrado. Preparar por equipo.
- 500 ml de Solución acetonitrilo agua 65:35. Preparar por equipo.
- 500 ml de agua desionizada. Preparar por equipo.
- Columna analítica C18 (con pre-columna incluida) de 150 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno.

### Procedimiento.

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 sonicada previamente durante media hora a 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 (aproximadamente una hora). Una vez preparado el equipo, inyectar 20 µl 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 deberá ser enjuagado 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.

## **REFERENCIA RÁPIDA PARA MANEJO DEL HPLC WATERS**

### **Materiales a emplear y equipo**

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (integrado por una bomba cuaternaria, una válvula inyectora Reodyne provista de un loop de inyección de 10 µl, un detector de arreglo de diodos de longitud de onda variable)
- Columna analítica marca Alltech econosphere C18 con precolumna incluida (fase reversa unida químicamente formada por cadenas de hidrocarburo lineal de 18 átomos de carbono) de 150 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno.
- Buffer fosfato 0,025 M; pH=3; calidad HPLC.
- Metanol calidad HPLC.
- Jeringa de 5 ml con soporte para membranas de 0,45 ó 0,22 micrones. Filtros de nylon de 0,45 ó 0,22 micrones.
- Estándares de cafeína
- Muestra problema

1. Preparación del disolvente y la muestra a analizar. Ambos deben ser filtrados en membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , para evitar que impurezas entren y contaminen la columna.
2. Prender el Desgasificador. Esperar a que pase prueba de vacío (cambia la luz del foquito de amarillo a verde).
3. Revisar que el sistema de salida de los disolvente y entrada de aire, estén sumergidos en sus respectivos recipientes.
4. Prende el Waters 600 Controller.
5. Antes de colocar la columna, enjuagar el circuito con agua desionizada y filtrada el circuito.
6. Ajustar el flujo oprimiendo los botones respectivos y oprime ENTER para aceptar los cambios.
7. Retira los tapones colocados a ambos extremos de la columna cromatográfica.
8. Coloca la columna dentro del horno de calentamiento. OJO, la columna debe estar orientada de tal modo que la dirección del flujo de hacia el operador.
9. Ajustar el flujo oprimiendo los botones respectivos y oprime ENTER para terminar esta operación. El flujo a través de la columna se deberá ir aumentando poco a poco, se recomienda hacerlo en intervalos de 0.1ml/min cada 3 minutos hasta alcanzar el flujo deseado.
10. Dejar acondicionando la columna hasta que la presión permanezca constante.

### **Adquisición de datos: Programa EMPOWER**

11. Prende la computadora y haz click en el icono del programa EMPOWER.
12. Escribe el nombre del usuario “System” y la contraseña “manager”
13. Selecciona el subprograma RUN SAMPLES y dentro de éste selecciona como Project “WATERS” y como Chromatographic System el tipo de integrador que vas a utilizar: PDA (photodiode array), iones (conductivity) o IR (Differential refractometer).
14. En la pantalla desplegada selecciona el “Method set” e “Instrument Method” que utilizarás.