

Dosage de la caféine dans un soda-cola par HPLC

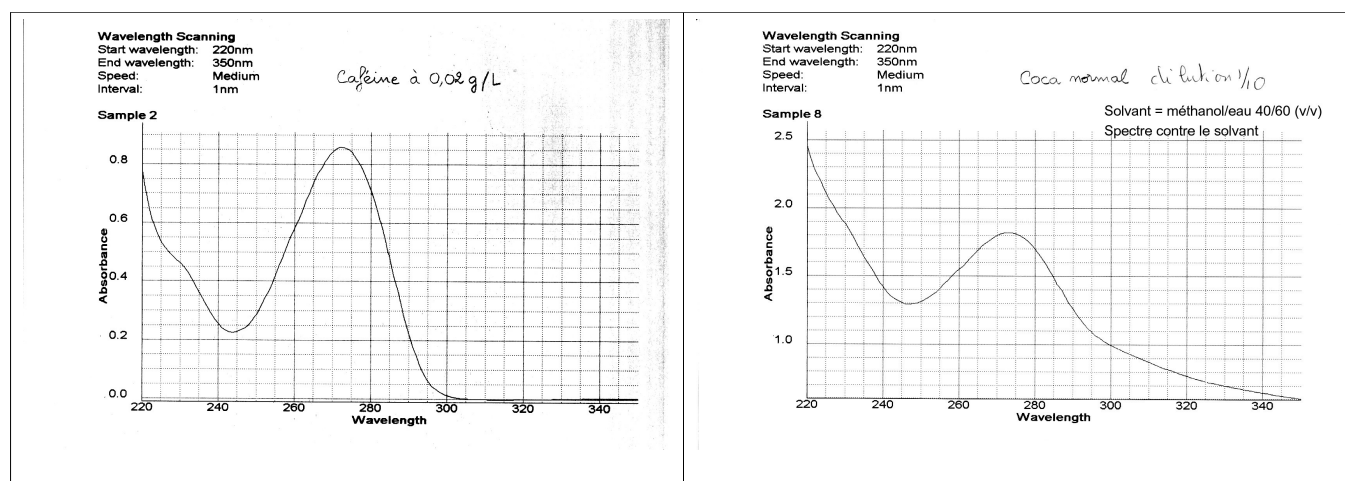
La technique utilisée est la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). La phase stationnaire est constituée de grains d'une silice greffée d'un motif hydrocarboné apolaire en C18 (polarité de phase inversée). La phase mobile est un mélange polaire méthanol/eau utilisé en élution isocratique ou gradient. L'éluat est suivi en continu par spectrophotométrie à 272 nm. Le dosage est possible par la méthode de l'étalonnage externe, par la méthode des ajouts dosés, après extraction liquide/liquide et utilisation d'un étalon interne.

C1. Préalable

Il s'agit essentiellement de justifier le réglage du détecteur de sortie de colonne HPLC, un spectrophotomètre en ligne réglé sur 272 nm.

On propose le spectre d'une solution étalon de caféine à 0,02 g/L en solvant méthanol/eau 4/60 (v/v), contre le solvant, dans l'intervalle 230 nm - 400 nm.

On propose aussi le spectre d'absorption du soda-cola fourni dilué au 1/10 en solvant méthanol/eau 4/60 (v/v), contre le solvant, dans l'intervalle 230 nm - 400 nm.



Discussion : spectres annotés.

C2. Réactifs et conditions opératoires générales pour les chromatographies

- Méthanol et eau pour réaliser la phase mobile.
- Injecteur à boucle d'injection de 20 μL équipé d'un filtre 0,45 μm .
- Colonne de silice greffée en C18 (de 15 cm de longueur et de 0,4 cm de diamètre) avec précolonne de protection ; débit à 0,5 mL/min.
- Détecteur spectrophotométrique à lecture continue réglé à 272 nm. Enregistreur-intégrateur à atténuation réglable et vitesse du papier d'enregistrement réglable.
- Coca-cola® et coca-cola® décaféiné, 'café' et 'café décaféiné' à partir de café moulu commercial.
- Solution étalon de caféine à 0,2 g/L dans du méthanol qualité HPLC, à filtrer et à dégazer.

Utilisation de la chaîne HPLC disponible

L'appareil proposé réalise les gradients. L'appareil proposé possède un système de dégazage des solvants sous vide. Préparer du méthanol filtré sur filtre 0,45 μm et un mélange eau/méthanol 90v/10v filtré sur filtre 0,45 μm . Programmer l'élution : on pourra par exemple

commencer par une élution isocratique en méthanol/eau 40v/60v puis on adaptera. (On n'utilise pas de solvant eau pure pour éviter les problèmes de microorganismes.)

Mettre en route le spectrophotomètre en ligne : commutateur supérieur sur AU ; commutateur Range sur 0,1. Régler la longueur d'onde.

Mettre en route l'intégrateur :

- Vérifier que le branchement au spectrophotomètre est correct.
- Vitesse défilement CHSP . 0,5 (en mL/min).
- Atténuation : ATTN : 512 a priori au départ pour l'étalon caféine à 0,2 g/L et à optimiser.

Amorçage de la pompe et vérification du circuit :

- amorçage éventuel de la pompe par le responsable du TP selon le mode opératoire dédié. Fermeture de la purge.
- Vérification que le circuit ne contienne pas la moindre bulle d'air (par le responsable du TP).

Mettre en route la pompe à 0,5 mLmin⁻¹. La pression doit monter et se stabiliser en dessous de 100 bars. Attendre environ 20 min pour que la colonne s'équilibre. Faire alors l'Autozéro sur le spectrophotomètre, régler la détection de pic par PTEVAL (pic threshold evaluation).

L'analyse peut commencer. Prendre bien soin de filtrer les échantillons lors de l'introduction à l'aide des embouts filtres adaptés en tête d'injecteur. Bien repérer les positions « LOAD » et « INJECT » de l'injecteur. L'enregistrement se déclenche par la touche « START ».

Lors des analyses en mode gradient, prévoir un programme de retour aux conditions initiales avec temps de stabilisation de la colonne.

Pour le nettoyage terminal : laisser fonctionner la pompe pendant quelques heures à un débit de 0,1 mL/min en éluant méthanol 100%.

C3. Travail pratique

C3.1 Mise en évidence d'un pic caféine ? Dosage de la caféine en étalonnage externe. Mode isocratique avec la phase mobile méthanol/eau 40v/60v.

Chromatographier respectivement un étalon caféine à 0,2 g/L, un échantillon « coca dégazé » = Ecola+, un échantillon « coca décaféiné dégazé » = Ecola-, un mélange v/v Ecola- et étalon caféine à 0,2 g/L, un étalon caféine à 0,1 g/L, un étalon caféine à 0,05 g/L, un étalon caféine à 0,02 g/L, un « café dilué au 1/10 dans de l'eau » = Ecafe+, un « café décaféiné dilué au 1/10 dans de l'eau » = Ecafe-. Réaliser l'intégration de chaque pic des chromatogrammes obtenus.

Discussion :

- *Tableau de réalisation des étalons caféine (quel solvant de dilution a été utilisé ?).*
- *Analyse des chromatogrammes (est-on certain de mesurer la caféine ?).*
- *Calcul des concentrations en caféine dans les échantillons dosés.*

C3.2 Avec une élution gradient optimisée par rapport à la précédente.

Choisir un programme d'élution. Chromatographier respectivement un étalon caféine à 0,2 g/L, un échantillon « coca dégazé » = Ecola.

Discussion :

- *Quel gradient a été programmé ? Pourquoi ?*
- *comparer avec les résultats obtenus précédemment. Interpréter.*

C3.3 Dosage de la caféine du Coca-cola® par HPLC et méthode des ajouts dosés

Construire un tableau proposant un mode opératoire pour un dosage de la caféine du Coca-cola par méthode des ajouts dosés. On proposera 4 solutions plus ou moins chargées en étalon externe caféine. Chromatographie avec la phase mobile méthanol/eau 40v/60v.

Discussion :

- *Tableau de conception de gamme d'étalonnage en ajouts dosés.*
- *Résultats obtenus.*

C3.4 Dosage de la caféine du Coca-cola® par HPLC après extraction liquide/liquide et utilisation d'un étalon interne

Solvant d'extraction proposé : acétate d'éthyle. Etalon interne proposé : benzoïne. Proposer un mode opératoire. Mettre en œuvre.

Discussion :

- *Mode opératoire établi.*
- *Résultats obtenus.*

C4. Bibliographie

- Yost, Etre, Conlon, traduction de Vaumoron, « pratique de la chromatographie liquide », Tec & Doc, 1981.
- Beckers, « the determination of caffeine in coffee : sense or nonsense ? », journal of biochemical education, 2004, 81 :1.
- Angelika Gratzfeld-Hüsgen and Rainer Schuster, HPLC for Food Analysis, document Agilent Technologies Company, sept. 2001
- Données fournies par Patrick Vanneste