Dosage de la caféine dans un soda-cola par HPLC

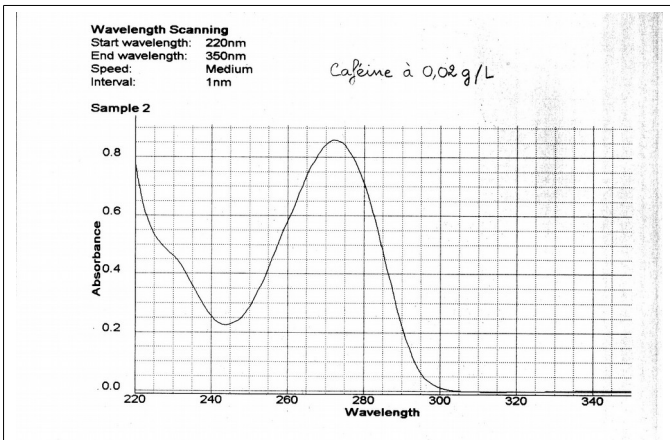
La technique utilisée est la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). La phase stationnaire est constituée de grains d'une silice greffée d'un motif hydrocarboné apolaire en C18 (polarité de phase inversée). La phase mobile est un mélange polaire méthanol/eau utilisé en élution isocratique ou 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

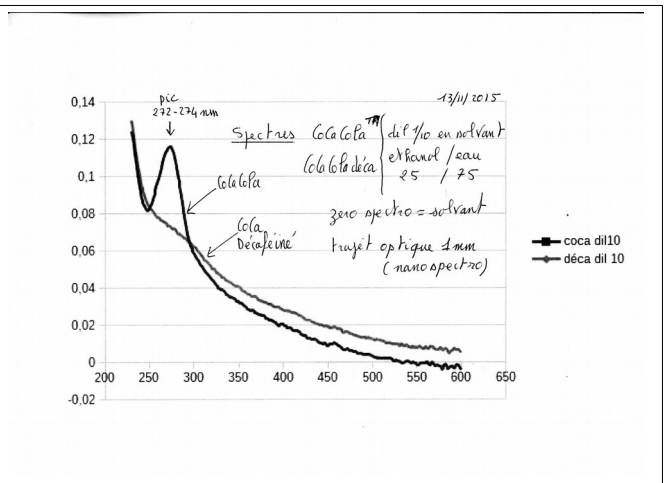
Il s'agit essentiellement de justifier le réglage du détecteur de sortie de colonne HPLC, un spectrophotomètre en ligne réglé sur 272 nm.

On propose le spectre d'une solution étalon de caféine à 0,02 g/L en solvant ethanol/eau 25/75 (v/v), contre le solvant, dans l'intervalle 230 nm – 400 nm.

On propose aussi les spectres d'absorption du soda-cola et de sa version décaféinée dilués au 1/10 en solvant éthanol/eau 25/75 (v/v), contre le solvant, dans l'intervalle 230 nm – 400 nm.



Cuve quartz, 1cm trajet optique, solvant éthanol eau (25v/75v)



Discussion : spectres annotés.

C2. Réactifs et conditions opératoires générales pour les chromatographies

- Ethanol et eau pour réaliser la phase mobile.
- Injecteur manuel à boucle d'injection de 20 µL (équipé en entrée de filtres jetables) 0,45 µm.
- Colonne de silice greffée C18 (de 15 cm de longueur et de 0,4 cm de diamètre) avec précolonne de protection ; débit à 0,3 ou 0,4 mL/min.
- Détecteur spectrophotométrique à lecture continue réglé à 272 nm. Enregistrement informatique et intégration informatique des données.
- Coca-cola® et coca-cola® décaféïné, 'café' et 'café décaféiné' à partir de café moulu commercial, mouture de grains de café.
- Solution étalon de caféine à 0,2 g/L en éthanol/eau (25v/75v) qualité HPLC, à filtrer.

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 de l'éthanol filtré sur filtre 0,45 µm (solvant B) et un mélange eau/éthanol 75v/25v (solvant A) filtré sur filtre 0,45 µm. Programmer l'élution : on

pourra par exemple commencer par une élution isocratique en éthanol/eau 25v/75v puis on adaptera. (On conseille de ne jamais conditionner de flacon de solvant éthanol/eau à moins de 22 % d'éthanol afin d'éviter les pollutions par microorganismes.)

Mettre en route le spectrophotomètre en ligne . Régler la longueur d'onde.

Mettre en route le système informatique d'enregistrement des chromatogrammes :

- Vérifier que le branchement au spectrophotomètre est correct.
- Lancer le logiciel, choisir l'instrument dénommé "hplc".

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 0,3 $mLmin^{-1}$ en mode isocratique en solvant éthanol/eau 25v/75v. La pression doit monter et se stabiliser vers 40 bars (très en dessous de 100 bars). Attendre environ 20 min (ou plus) pour que la colonne s'équilibre parfaitement. Faire alors l'Autozéro sur le spectrophotomètre.

Les analyses peuvent alors 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 manuel. 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 3 heures à un débit de 0,1 mL/min en éluant éthanol/eau 25v/75v puis 30 min en éthanol 100% (plus éventuellement un rinçage supplémentaire à l'acétonitrile 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 éthanol/eau 25v/75v.

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/v Ecola- et étalon caféine à 0,2 g/L et solvant, un étalon caféine à 0,1 g/L, un étalon caféine à 0,05 g/L, un étalon caféine à 0,025 g/L, un étalon caféine à 0,02 g/L, un « café dilué au 1/10 dans du solvant» = Ecafe+, un « café décaféiné dilué au 1/10 dans du solvant» = 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 pour optimiser l'analyse. Chromatographier respectivement un étalon caféine à 0,1 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. Par exemple :

	1	2	3	4	5
Étalon caféine g/L	0,02	0,025	0,05	0,075	0,1
Coca cola	Mélangé volume à volume avec l'étalon				
Masse de caféine étalon ajoutée dans le volume injecté (20µL) µg					
Surface pic caféine					

Chromatographier avec la phase mobile éthanol/eau 25v/75v.

Discussion :

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

C3.4 Dosage de la caféine par HPLC après extration liquide/liquide ou solide/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 pour doser la caféine d'une boisson (café, Coca cola...) ou de grains de café moulus.

Discussion :

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

C4. Bibliographie

- Yost, Ettre, 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