



### **SUPUESTO PRÁCTICO 1**

Se desea conocer mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) la concentración de cafeína de dos muestras comerciales de café, una con cafeína y la otra descafeinada. El rango hipotético de concentración para un café con cafeína es de (5-20 ppm) y el de un café sin cafeína es de (0-4 ppm). Para la calibración tenemos cafeína comercial de Sigma Aldrich, PM: 194,18, CAS 58-08-2.

#### **1.- Cuestión 1:**

Explique brevemente cómo haría la calibración de la cafeína partiendo de la cafeína comercial mediante la técnica de HPLC. Observación: Se considera que el método de HPLC para la cafeína es conocido, no hay que ponerlo a punto.

Partiendo de una disolución patrón concentrada de cafeína, se prepararían muestras diluidas de cafeína de concentración conocida y se harían dos rectas de calibración una para la muestra con cafeína y la segunda para la recta de la muestra sin cafeína con disoluciones más diluidas. La recta de calibración correlacionaría el área del pico del cromatograma con concentraciones de analito de la muestra y mediante interpolación podríamos cuantificar muestra problema.

También, aunque menos adecuado, se podría hacer una recta de calibración para los dos rangos

#### **2.- Cuestión 2:**

Indique como se prepararía una disolución patrón de 1000 ppm de cafeína en 50mL de agua ultrapura (eluyente), suponiendo que la cafeína es soluble en dicho eluyente a 25°C. (1ppm=1mg/L).

Se pesan en una balanza de precisión 50 mg de cafeína y se diluyen en 50 mL de agua ultrapura utilizando un matraz aforado.

#### **3.- Cuestión 3**

**¿Qué tipo de agua y de disolventes utilizaría para HPLC?**

Agua ultrapura y disolventes específicos para HPLC.



#### 4.- Cuestión 4

**¿La muestra se diluye solo en agua o es mejor hacerlo en los disolventes y proporciones que se van a utilizar en HPLC? Razone su respuesta.**

Lo mejor es diluir la muestra en los disolventes y proporciones lo más idénticas posibles a la fase móvil para evitar precipitaciones en la columna o en el inyector, para evitar distorsiones en los picos del cromatograma y una mayor reproducibilidad y resolución del espectro.

#### 5.- Cuestión 5:

Para hacer la recta de calibrado de la muestra del café con cafeína, se preparan cinco disoluciones de concentración conocida cuyo volumen final es 1mL. Dichas disoluciones se preparan partiendo de la disolución patrón de 1000ppm que se ha preparado en la segunda cuestión.

- Calcule los volúmenes de disolución concentrada y disolvente y rellene la tabla.
- Indique brevemente que material de laboratorio utilizaría para medir los volúmenes y como procedería para reducir al máximo errores de medida.

| Concentración (ppm) | Volumen de disolución cafeína 1000ppm (μL) | Volumen disolvente (μL) |
|---------------------|--------------------------------------------|-------------------------|
| 1                   | 1                                          | 999                     |
| 2                   | 2                                          | 998                     |
| 5                   | 5                                          | 995                     |
| 10                  | 10                                         | 990                     |
| 20                  | 20                                         | 980                     |

Micropipeta, es mejor preparar la disolución más concentrada e ir haciendo diluciones a la mitad para evitar errores de medida.

#### 6.- Cuestión 6:

Para hacer la recta de calibrado de la muestra del café sin cafeína, se preparan cinco disoluciones de concentración conocida cuyo volumen final es 1mL. Dichas disoluciones se preparan partiendo de la disolución patrón de 1000ppm que se ha preparado en la segunda cuestión.



Segundo ejercicio de la fase de oposición de las pruebas selectivas convocadas por resolución rectoral de 18 de octubre de 2024 (BOE del 31 de octubre). FACULTAD DE CIENCIAS. UNED LAB. Plaza: LCIE0030.

- Calcule los volúmenes de disolución concentrada y disolvente y rellene la tabla.
- Indique brevemente que material de laboratorio utilizaría para medir los volúmenes y como procedería para reducir al máximo errores de medida.

| Concentración (ppm) | Volumen disolución cafeína 1000ppm (UL) | Volumen disolvente (ML) |
|---------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
| 0.125               | 0.250                                   | 1999,75                 |
| 0.250               | 0.5                                     | 1999,5                  |
| 0.5                 | 1                                       | 1999                    |
| 1                   | 2                                       | 1998                    |
| 2                   | 4                                       | 1996                    |
| 4                   | 8                                       | 1992                    |

Se prepararía la disolución concentrada con micropipeta y a partir de ahí hacer diluciones a la mitad

#### 7.- Cuestión 7:

Explique brevemente este método de HPLC para la cafeína

| Parámetro                 | Valor                             |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Disolventes               | a) H <sub>2</sub> O<br>b) Metanol |
| Velocidad de flujo        | 1.0mL/min                         |
| Condiciones de elución    | 25% Metanol (isocrático)          |
| Tiempo de parada          | 12 min                            |
| Volumen de inyección      | 20µL                              |
| Limpieza de la aguja      | Metanol                           |
| Temperatura de la columna | 25°C                              |
| Detección                 | 272nm                             |



La fase móvil está formada por dos disolventes, agua y metanol, el agua en el canal A y el metanol, en el B. Se mezclarán de una manera constante, es decir 75% de agua y 25% de metanol durante todo el experimento, eso es lo que significa isocrático que no hay gradientes, y la velocidad será de 1 mL/min. El volumen de muestra inyectada en la columna es de 20 µL y después de pinchar en la columna la muestra, la aguja se lavará con metanol. El aparato tiene un sistema para mantener la temperatura constante y hemos elegido 25°C y la lámpara UV/VIS actuará a una longitud de onda de 272 nm.

#### **8.- Cuestión 8:**

**Una vez determinado el método de HPLC y preparadas las muestras hay que purgar el sistema ¿Qué significa purgar en HPLC?**

Significa hacer pasar disolvente (fase móvil) por las bombas, tuberías y sistema de inyección para:

- Eliminar aire o burbujas.
- Limpiar residuos de disolventes anteriores o sales.
- Estabilizar la presión y el flujo.

#### **9.- Cuestión 9:**

**Se va a utilizar para el experimento una columna C18, 4.6\*150mm, 5 µm de fase reversa ¿Qué significado tienen esos parámetros?**

- C18 se refiere a que la fase estacionaria de la columna está formada por cadena de 18 átomos de carbono unida a una sílice.
- 4,6 mm se refiere al diámetro interno de la columna y 150 mm es la longitud de la columna
- 5 micrómetros es el tamaño de partícula del relleno de la columna, a menor tamaño mayor resolución, pero también mayor será la presión
- -Fase reversa se refiere a que tiene fase estacionaria no polar, esto significa que retiene mejor las moléculas hidrofóbicas y deja pasar mejor las polares.

#### **10.- Cuestión 10:**

**¿Qué función tiene la lámpara UV en el HPLC y por qué el cromatograma se registra a 272 nm para la cafeína?**

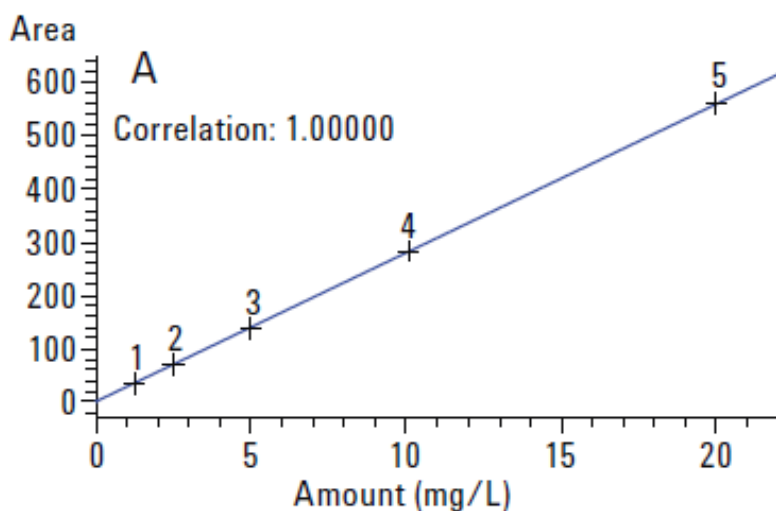
La lámpara UV (ultravioleta), normalmente una lámpara de deuterio, emite luz en el rango UV (190–400 nm). Esa luz pasa a través del flujo de eluyente (la mezcla de disolvente y muestra) que sale de la columna.

Muchos compuestos orgánicos absorben luz UV a ciertas longitudes de onda. Cuando eso ocurre, el detector registra una disminución en la intensidad de luz que pasa, lo que se traduce en un pico en el cromatograma.

272nm es la longitud de onda a la que la cafeína muestra mayor absorbancia.

#### 11.- Cuestión 11:

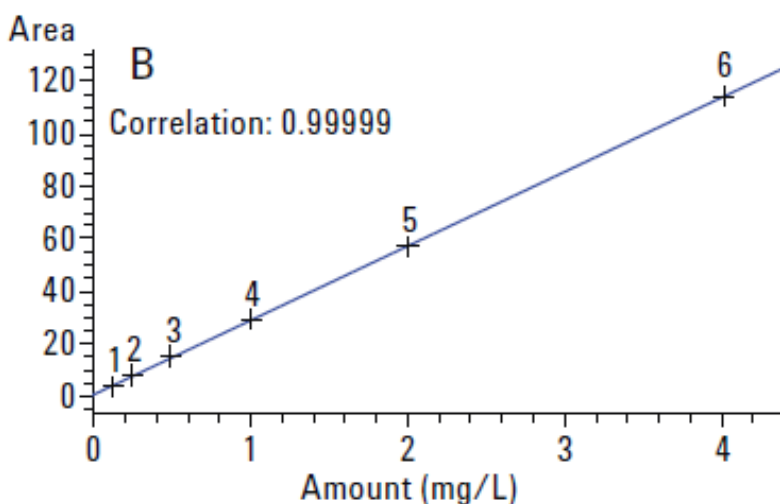
Se ha preparado la muestra problema con cafeína partiendo de 0.5 g de en 200 mL de agua y se ha calentado a 90 °C durante 20 min en un matraz con agitación, la disolución se ha evaporado a vacío y se ha vuelto a disolver en el eluyente del método, se ha filtrado y puesto en un vial para HPLC. Se ha hecho el cromatograma con las condiciones del método de la cuestión 7. Si el área de la muestra sin cafeína es 400 interpole (aproximadamente) los resultados en esta recta de calibrado y diga cual es la concentración de café en ppm.



15 ppm

### 12.- Cuestión 12:

Se ha preparado la muestra problema sin cafeína partiendo de 0.5 g de en 200 mL de agua y se ha calentado a 90 °C durante 20 min en un matraz con agitación, la disolución se ha evaporado a vacío y se ha vuelto a disolver en el eluyente del método, se ha filtrado y puesto en un vial para HPLC. Se ha hecho el cromatograma con las condiciones del método de la cuestión 7. Si el área de la muestra sin cafeína es 80 interpole (aproximadamente) los resultados en esta recta de calibrado y diga cual es la concentración de café en ppm.



3 ppm

### 13.- Cuestión 13:

¿Qué significa que el límite de detección (LOD) de la cafeína en nuestro aparato es de 0.034 mg/L y el límite de cuantificación (LOQ) es de 0.113mg/L?

0.034 mg/L es el límite de detección, la concentración mínima de analito que se puede detectar, por debajo de esta concentración no es fiable y a esta concentración la cuantificación no es fiable.

0.113mg/L es el límite de cuantificación, valor mínimo al que se puede cuantificar con precisión.



**14.-Cuestión 14:**

**Calcule las molaridades de las muestras problema a partir de los resultados extraídos de las interpolaciones.**

15 ppm             $0.015\text{g} / 194,18 \text{ g/mol/L} = 0,000077\text{molar} = 77\mu\text{M}$

3 ppm             $15 \mu\text{M}$

**15.- Cuestión 15:**

**En el caso hipotético de que se inyectase un analito en el HPLC con el doble de peso molecular que la cafeína, pero los mismos ppm ¿Qué sucedería en el cromatograma?**

Si inyectas la misma masa (en mg) de ambas sustancias:

- La que tiene el doble de peso molecular tiene menos moles (menos moléculas).
- Por tanto, si el detector responde a la cantidad de moléculas (como ocurre en UV con absorción molar), la señal será más baja para la sustancia de mayor PM.



### **PREGUNTAS DE RESERVA**

**1. ¿Como operaria en el hipotético caso de tener dos picos de diferentes compuestos en un cromatograma de HPLC con el mismo tiempo de retención?**

- Cambiar la fase móvil: Cambiar la composición (por ejemplo, proporción agua/acetonitrilo). Ajustar el pH si se usan fases móviles con disoluciones tampón.
- Cambiar el gradiente de elución: hacerlo más lento o inclinado
- Cambiar la fase estacionaria: Probar con otra columna: por ejemplo, una C18 con diferente tamaño de poro o funcionalización diferente ejemplo C8

**2. El tiempo de retención (TR ) de la cafeína es de 6.7 minutos para esta columna y este método ¿qué significa esto y podemos aprovechar este dato?**

Es el tiempo que tarda el analito desde la inyección hasta que es detectado por el detector al final de la columna es de 6,7 minutos, con el mismo método y la misma columna los resultados tienen que ser reproducibles.