

DOSAGE DE LA CAFEINE DANS UN 'CAFE' ET DANS UN SODA-COLA

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 C8 (polarité de phase inversée). La phase mobile est un mélange polaire méthanol eau utilisé en élution isocratique. L'éluat est suivi en continu par spectrophotométrie à 272 nm car la caféine présente un pic d'absorbance à cette longueur d'onde (cf. spectre joint). Le dosage est effectué par la méthode de l'étalonnage externe.

1. Réactifs et conditions opératoires générales

- Méthanol et eau pour réaliser la phase mobile: à filtrer sur filtre 0,45µm et à dégazer
- Injecteur à boucle d'injection de 20µL équipé d'un filtre 0,45µm
- Colonne de silice greffée en C8 (de 15cm de longueur et de 0,4cm de diamètre) avec pré-colonne de protection; débit à 0,8mL/min
- Détecteur spectrophotométrique à lecture continue réglé à 254nm. 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 0,2g/L dans du méthanol qualité HPLC, à filtrer et à dégazer

2. Utilisation de la chaîne HPLC disponible

Filtrer les solvants utilisés avec des filtres convenables. Préparer les phases mobiles désirées (l'appareil proposé ne réalise pas de gradient) : une phase mobile méthanol/eau 40v/60v et une phase mobile 80% méthanol/eau 80v/20v. Dégazer. Commencer la manipulation avec la phase mobile méthanol/eau 40v/60v.

Mettre en route le spectrophotomètre: 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 : 128 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 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).

S'assurer alors que le commutateur de débit de la pompe indique 0,0mL.min⁻¹. Mettre en route la pompe: commutateur sur On et si le bouton « Reset » est en rouge, le pousser. Mettre le commutateur de débit à 2ml.min⁻¹: La pression doit monter et se stabiliser vers 500 à 1000 psi. On peut aussi vérifier que la pompe est amorcée en regardant s'il y a un rejet.

Ramener alors le commutateur de débit au débit de travail souhaité. Attendre environ 20 min pour que la colonne s'équilibre. Faire alors l'Autozéro sur le spectrophotomètre, mesurer le bruit de fond par PTEVAL.

L'analyse peut commencer. Prendre bien soin de filtrer les échantillons lors de l'introduction. Bien repérer les positions « LOAD » et « INJECT » de l'injecteur. L'enregistrement se déclenche par la touche « START ».

En cas de changement de composition de phase mobile, éviter toujours absolument les bulles d'air (voir ci-dessus) et attendre quelques minutes d'équilibration de la colonne avec la nouvelle phase avant

d'injecter.

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

3. Travail à réaliser

Avec la phase mobile méthanol/eau 40v/60v,,

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

Compte -rendu :

- analyse des chromatogrammes (est on certain de mesurer le caféine ?) ;
- calcul des concentrations en caféine dans les échantillons dosés.

Avec la phase mobile méthanol/eau 80v/20v.

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

Avec une phase mobile méthanol pur.

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

Compte -rendu :

- comparer avec les résultats obtenus précédemment. Interpréter.

Bibliographie :

- Yost, Ettre, Conlon, traduction de Vaumoron, « pratique de la chromatographie liquide », Tec & Doc, 1981.
- Beckers, « thé détermination of caffeine in coffee : sense or nonsense ? », journal of biochemical education, 2004, 81 :1.