

## **Esp.1: DETERMINAZIONE DELLA CAFFEINA NELLE BEVANDE MEDIANTE ANALISI IN RP-HPLC-UV (metodo delle aggiunte multiple)**

### **SCOPO DELL' ESPERIENZA:**

Determinazione del contenuto di caffeina in una bevanda a base di cola mediante RP-HPLC-UV.

### **REAGENTI:**

- Caffeina;
- Acqua ultrapura;
- Metanolo di purezza per analisi in tracce (HPLC grade).

### **APPARECCHIATURA:**

Materiale corrente da laboratorio, in particolare:

- bilancia analitica;
- cilindro graduato da 50 ml;
- matracci da 250 ml, 100 ml;
- buretta da 25 ml, 10 ml;
- bagno ad ultrasuoni (Soltec);
- microsiringa per cromatografia (100  $\mu$ L);
- siringhe di plastica da 5 mL e filtro micropori in GHP (porosità 0.45  $\mu$ m);
- cromatografo HPLC "Thermo Separation" con degassificatore e detector UV (lettura a 272 nm), dotato di loop da 20  $\mu$ L, colonna Idrosil C18, 15x4, 6mm e alimentato da Fase mobile A (80:20 acqua:metanolo) e Fase mobile B (metanolo)

### **PROCEDIMENTO:**

Prelevare circa 40 ml di bevanda dal contenitore originale, usando cilindro e trasferendo in un becher e degassare la soluzione impiegando il bagno ad ultrasuoni per 5 minuti.

Preparare una soluzione standard di caffeina a 100 ppm in un matraccio da 250 ml portando a volume con acqua ultrapura.

Preparare 5 soluzioni diluite in matracci da 100 mL (diluendo con acqua ultrapura) contenenti:

- Soluzione 1:50 di bevanda (2 x);
- Soluzione 1:50 di bevanda & 1 ppm di standard di caffeina;
- Soluzione 1:50 di bevanda & 3 ppm di standard di caffeina;
- Soluzione 1:50 di bevanda & 5 ppm di standard di caffeina.

Filtrare un'aliquota di ogni soluzione mediante filtro micropori raccogliendo il filtrato in un becher pulito da cui si prelevano 100  $\mu$ L con la microsiringa per effettuare l'iniezione nello strumento.

**LAVAGGIO VETRERIA:** risciacquo con acqua corrente, poi acqua distillata ed infine acqua ultrapura.

### **ESPRESSIONE DEI RISULTATI**

Costruire la retta di taratura delle "aggiunte multiple" ponendo in grafico area vs. concentrazione di caffeina (ppm) e, dopo aver interpolato i punti, calcolare la concentrazione di caffeina nella bevanda considerando il valore assoluto dell'intercetta della retta di interpolazione con l'asse x.

Il valore è espresso come numero intero, senza cifre decimali.