

Experimento 1 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Determinação de cafeína em amostras de chá

1. Objetivo

Determinação de cafeína em amostras de chá utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2. Materiais e reagentes

- Balão volumétrico de 10 mL (6)
- Béquer de 10 mL (2)
- Béquer de 250 mL (1)
- Vidro de relógio (1)
- Chapa de aquecimento
- Pipeta volumétrica 0,5 mL (1)
- Pipeta volumétrica 1 mL (1)
- Pipeta volumétrica 2 mL (1)
- Pipeta volumétrica 3 mL (1)
- Proveta de 250 mL
- Termômetro de 100°C
- Eppendorf de 2 mL (2)
- Bastão de vidro médio
- Micro seringa de vidro
- Bacia com gelo
- Água Milli-Q
- Membrana 0,45 µm di do poro
- Padrão analítico de cafeína
- Amostras de chá

3. Instrumentação

- Cromatógrafo Líquido - Shimadzu
- Detector: Arranjo de Diodo – Modelo: SPD-10ADVP ($\lambda = 254 \text{ nm}$)
- Injetor Reodyne com Loop (alça de amostragem) de 20 µL
- Coluna: SGE C18: (250 mm x 4,6 mm D.I., diâmetro da partícula 5µm e diâmetro do poro = 120 Å).
- Pressão máxima da coluna: 300 Kgf/cm²
- Microseringa 100 µL.

4. Condições cromatográficas

- Fase móvel- Metanol: solução aquosa ácida pH 3,5 (50:50 v/v)
- Vazão: 1 mL/min
- Alça de amostragem: 20 µL

5. Procedimento experimental

5.1. Solução-padrão da cafeína

Partindo da solução-padrão de cafeína na concentração $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, preparar 5 soluções (10 mL) nas seguintes concentrações: 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 e $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$. Estas soluções diluídas deverão ser preparadas em solução de metanol 50%, pH=3,5. Injetar em triplicata cada uma das concentrações.

5.2. Preparo da amostra de “chá”:

Pesar a massa correspondente a um sachê de chá. Mergulhar a amostra de chá em 200 mL de água (MilliQ) à 80° C por 10 minutos. Após atingir à temperatura ambiente, pipetar 3,0 mL da amostra em balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com a solução de metanol 50%, pH 3,5. Filtrar, com auxílio da micro seringa de vidro em membrana com porosidade $0,45 \mu\text{m}$, recolher o filtrado em eppendorf e injetar no CLAE nas condições indicadas no item 4.

6. Questões

1) Traçar a curva analítica para a determinação de cafeína (Área do padrão vs concentração). Determinar a concentração de cafeína na amostra desconhecida. A partir das concentrações de cafeína encontradas pelos grupos, discuta a precisão intra-ensaio do método, ou seja, o coeficiente de variação (CV).

$$CV = s \cdot 100/x, \text{ onde } s \text{ é o desvio padrão e } x, \text{ a média das concentrações.}$$

2) Determinar a concentração de cafeína (m/m) em relação a massa do sachê de chá utilizado.

3) Discutir o mecanismo de separação em cromatografia líquida em fase reversa.

4) Otimizar as condições cromatográficas (proporções dos componentes da fase móvel e comprimento de onda)

5) Discutir os modos de eluição por gradiente e isocrática.