



# Determinación de cafeína en café mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

<b>Apellidos, nombre</b>	Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es) García Martínez, Eva (evgarmar@tal.upv.es) Fuentes López, Cristina (crifuelp@upvnet.upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Tecnología de los alimentos
<b>Centro</b>	Universitat Politècnica de València

## 1 Resumen de las ideas clave

La determinación de cafeína es un procedimiento muy empleado para la caracterización de ciertos alimentos que contienen cafeína de manera natural como son el café, el cacao o el té, y también para el control de calidad en ciertos donde la cafeína se emplea como ingrediente, como son los refrescos y las bebidas energéticas. En este artículo vamos a describir un procedimiento analítico utilizado para la determinación de cafeína empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa y detección UV.

## 2 Introducción

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide perteneciente al grupo de las metilxantinas que presenta efectos diuréticos y estimulantes. La cafeína también es conocida como teína, mateína, guaranina, metilteobromina o metilteofilina, haciendo referencia a las diferentes plantas a partir de las cuales se puede extraer este compuesto como son el café, el té, el guaraná, el chocolate, la yerba mate o la nuez de cola.

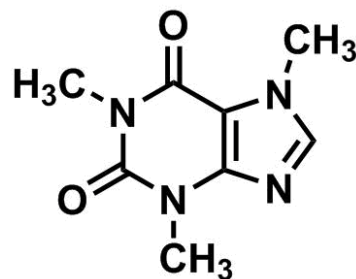


Figura 1. Molécula de cafeína

La determinación analítica de la cafeína es una determinación importante tanto en la industria farmacéutica como en la industria alimentaria. En la formulación de medicamentos, la cafeína se emplea como estimulante respiratorio en neonatos o para el tratamiento de la migraña y otros tipos de cefaleas [1]. En la industria alimentaria, el análisis de la cafeína es una técnica de control de calidad de ciertos productos que incorporan este compuesto como ingrediente como es el caso de refrescos y bebidas energéticas, y de determinados productos que la contienen de manera natural como son el café, el cacao o el té.

La fuente de cafeína más conocida es el grano de café, a partir del cual se elabora la bebida de café. El contenido de cafeína en los granos verdes de café se encuentra muy ligado a la especie de procedencia. Entre las distintas especies de café conocidas, destacan las variedades Arábica (*Coffea Arábica*) y Robusta (*Coffea Canephora*) por ser las de mayor producción a nivel mundial, de manera que el cultivo de estas dos variedades supone más del 90% de la producción mundial de café. Los granos de café obtenidos a partir de estas variedades presentan una composición y características organolépticas muy diferentes. Respecto a su contenido en cafeína, los cafés pertenecientes a la variedad Robusta son los que presentan una mayor concentración, que oscila entre el 1,7



y el 3,5%, frente al 0,8 y 1,5% de los cafés de la variedad arábica<sup>[2]</sup>. Es decir, una taza de café arábica contiene el doble de cafeína, o incluso más, que una taza de café robusta frente. Esto hace que el café robusta sea más amargo.

El contenido en cafeína del café también se ve afectado por otros aspectos como son los tratamientos post-cosecha a los que es sometido el grano antes de su comercialización. Finalmente, la cantidad de cafeína que contiene una taza de café estará también determinada por la forma de elaboración, la cantidad de café empleada en la preparación y el tiempo de extracción, entre otros factores.

En el organismo, la cafeína tiene importantes efectos sobre el sistema nervioso, corazón, sistema renal, gastrointestinal y respiratorio. Debido a estos efectos fisiológicos, cada vez es mayor la demanda de productos libres de cafeína y también es mayor el interés de los consumidores por conocer el contenido exacto de cafeína en los productos que la contienen.

En la actualidad, las técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de cafeína en alimentos y bebidas son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la electroforesis capilar y la espectrofotometría UV. Entre estas técnicas, destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por ser muy selectiva, sensible y versátil. Sin embargo, la elección de una técnica u otra para cuantificar el contenido en cafeína de un producto va a depender además de otros aspectos como son la disponibilidad de equipamiento adecuado, el volumen de muestras a analizar, el rango de concentraciones de trabajo, etc.

### 3 Objetivos

Con este artículo se pretende que el alumno sea capaz de:

- Llevar a cabo la determinación de cafeína empleando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV).
- Calcular la concentración de cafeína en diferentes muestras de café a partir de los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico.

### 4 Desarrollo

En primer lugar, vamos a describir el procedimiento para la determinación de cafeína empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). A continuación, veremos un ejemplo práctico del cálculo de la concentración de cafeína en una muestra de café convencional y en una muestra de café descafeinado.

#### 4.1 Fundamento

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de cafeína en alimentos y bebidas. Antes de llevar a cabo el análisis cromatográfico para su cuantificación, es necesario emplear un proceso adecuado de extracción de la cafeína en las muestras de café, que nos permita separar el principio activo de la matriz y extraer la mayor cantidad posible del compuesto. La cafeína es una sustancia muy soluble en agua, siendo esta solubilidad dependiente de la temperatura. Es por ello, que la extracción de la cafeína empleando temperaturas que oscilan entre los 80 y los 100 °C mejorarán la extracción de este compuesto. Además, el empleo de óxido de



magnesio o ferrocianuro de zinc durante la extracción nos permitirá eliminar determinadas sustancias como el ácido clorogénico, que pueden interferir en la medida posterior.

Una vez obtenido el extracto de la muestra, este será analizado por cromatografía de alta resolución (HPLC) en fase reversa empleando un detector UV. La cuantificación de la cafeína presente en la muestra se llevará a cabo por el método del patrón externo.

## 4.2 Materiales y reactivos

### Material e instrumentación:

- Balanza analítica
- Matraces Erlenmeyer
- Micropipetas
- Jeringa y filtros de jeringa de celulosa regenerada de 0.45  $\mu\text{m}$
- Matraces aforados de 10 mL
- Sistema de desgasificación de la fase móvil: baño ultrasonidos
- Viales de inyección
- Equipo cromatográfico: HPLC con detector UV-visible

### Reactivos químicos:

- Agua calidad HPLC
- Metanol calidad HPLC
- Disolución acuosa de cafeína (1000 ppm)

## 4.3 Procedimiento experimental

A continuación, vamos a ver con un ejemplo como determinar el contenido de cafeína de una muestra de café molido. El procedimiento analítico que se describe a continuación está basado en el protocolo descrito en la norma ISO 20481<sup>[3]</sup>.

### 1. Preparación de las disoluciones patrón

Partimos de una disolución de cafeína 1000 mg cafeína/L, a partir de la cual preparamos una serie de disoluciones patrón que serán empleadas para la elaboración de la recta de calibrado. Las disoluciones de cafeína obtenidas a partir de esta disolución madre son 2, 10, 50, 100 y 250 ppm de cafeína (mg cafeína/L disolución)

### 2. Preparación del extracto de la muestra

Para llevar a cabo la extracción de la cafeína a partir de las muestras de café se pesan 0.5 g de cada una de las muestras. A continuación, se introduce la muestra en un matraz Erlenmeyer al que se le añaden 0.5 g de MgO y 20 mL de agua bidestilada, se agita y se lleva a un baño a 90 °C con agitación suave durante 20 min.

Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugan y filtran empleando un filtro de celulosa regenerada de 0.45  $\mu\text{m}$ . Las muestras de café descafeinado se analizan directamente en el sistema cromatográfico (sin diluir), mientras que la muestra de café convencional (sin descafeinar) se debe diluir en relación 1:10.

### 3. Análisis de los extractos y patrones

Los extractos de las muestras preparados tal y como se ha descrito anteriormente y las disoluciones de los patrones se trasvasan a un vial de cromatografía. Por último, los viales



se introducen en el muestreador automático del equipo, donde se inyectarán 20  $\mu\text{L}$  en el equipo cromatográfico.

#### Condiciones cromatográficas

- Columna C18 (1540 x 4,6 mm y 5  $\mu\text{m}$ ) con pre-columna
- Detector: UV-vis a  $\lambda=273$  nm
- Fase móvil A: Metanol
- Fase móvil B: Agua
- Modo de elución: isocrático 25% metanol

#### 4. Identificación y cuantificación de la cafeína presente en la muestra

Para la identificación de la cafeína en la muestra, se inyectan en el equipo las disoluciones patrón preparadas tal y como se ha descrito anteriormente. La identificación de este compuesto en la muestra se lleva a cabo comparando el tiempo de retención ( $t_R$ ) correspondiente al pico observado en las disoluciones de los patrones con el  $t_R$  de los picos obtenidos en el cromatograma de las muestras.

La cuantificación de la cafeína se realiza mediante el método del estándar externo. Para ello, se inyectan en el equipo cromatográfico las disoluciones de cafeína a diferentes concentraciones. A partir de los cromatogramas registrados en el equipo, se calculan las áreas correspondientes para cada concentración. Con estos datos se construye una recta de calibrado, representando del área de cada uno de los picos frente a su concentración en el patrón.

A partir los cromatogramas de las muestras, se obtiene también el área del pico identificado como cafeína y empleando la ecuación de la recta de calibrado, se calcula la concentración de este compuesto en el extracto de la muestra de café.

### 4.4 Caso práctico

Como ejemplo de este procediendo de análisis vamos a determinar el contenido en cafeína de dos muestras de café; un café descafeinado y un café sin descafeinar.

La concentración de cafeína en el café puede estar influenciada por múltiples factores, como la variedad, el tipo de procesado el procedimiento de elaboración, entre otros. La cafeína le proporciona al café sus características organolépticas y propiedades antioxidantes. Sin embargo, un exceso de cafeína provoca un aumento de la tensión arterial y puede llegar a suponer un mayor riesgo cardíaco, por lo que en personas con hipertensión o enfermedades cardiovasculares no se recomienda el consumo de cafeína.

Mediante el proceso de "descafeinado" se elimina la mayor parte de la cafeína al café y a los extractos de café. Tras la aplicación de este proceso, el café (independientemente de si se trata de un café de tueste natural, torrefacto o mezcla) no podrán contener un contenido de cafeína superior al 0.1% (expresado como cafeína anhidra sobre materia seca), mientras que, en los cafés solubles, instantáneos o en los extractos de café este contenido máximo se estable en 0.3% (g cafeína anhidra por 100 g de materia seca procedente del café). Tal y como se establece en la legislación, el etiquetado de estos productos incluirá la mención "descafeinado" en el mismo campo visual que la denominación de venta.

Para la determinación del contenido en cafeína de dos muestras de café molido de tueste natural, una de ellas con la mención de "café descafeinado" y establecer si cumplen los requerimientos establecidos en la legislación, vamos a proceder según el protocolo de análisis descrito anteriormente.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el análisis cromatográfico de las disoluciones patrón nos permite identificar la cafeína en la muestra. De este modo, a partir del cromatograma de una de las disoluciones patrón (Figura 2) establecemos que el tiempo de retención para la cafeína es 2.20 min.

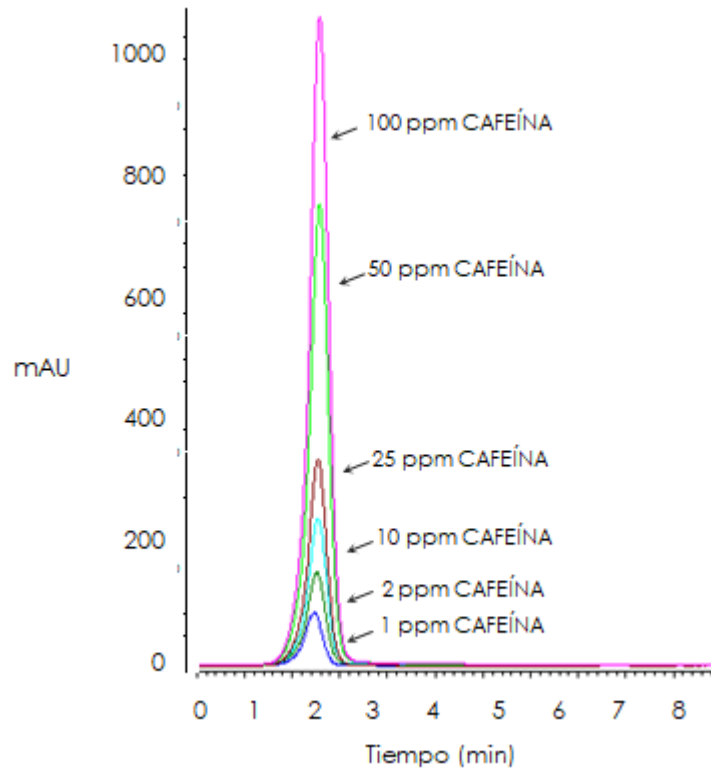


Figura 2. Cromatogramas de las disoluciones patrón de cafeína

Además, al analizar disoluciones patrón de cafeína a diferentes concentraciones podemos calcular las áreas correspondientes al pico de este compuesto en cada una de las disoluciones (Tabla 1).

Patrón (mg CAFEÍNA/L)	$t_R$	Área
1	2,203	240548
2	2,203	478767
10	2,200	2317088
25	2,200	5704650
50	2,203	11232623
100	2,202	22204933

Tabla 1. Tiempo de retención y área de los picos de los cromatogramas de los patrones de cafeína.

La representación del área del pico correspondiente a la cafeína frente a los valores de concentración en cada una de las disoluciones patrón, nos permite obtener la recta de calibrado para este compuesto (Figura 3).

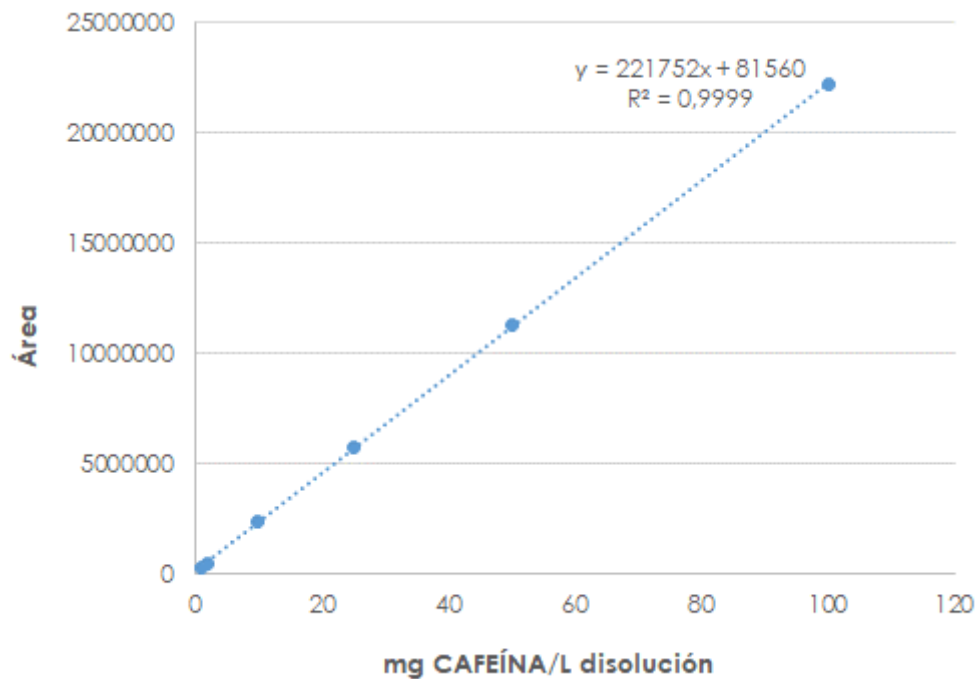


Figura 3. Recta de calibrado obtenida con los datos de la Tabla 1

Los extractos obtenidos a partir de las muestras se inyectan en el equipo HPLC empleando las mismas condiciones utilizadas para los patrones. El cromatograma de este extracto junto con el de una de las disoluciones patrón de cafeína se muestra en la figura 4. En esta figura se puede identificar el pico correspondiente a la cafeína, el cual presenta un tiempo de retención de 2.2 min ( $t_R=2.2$ ).

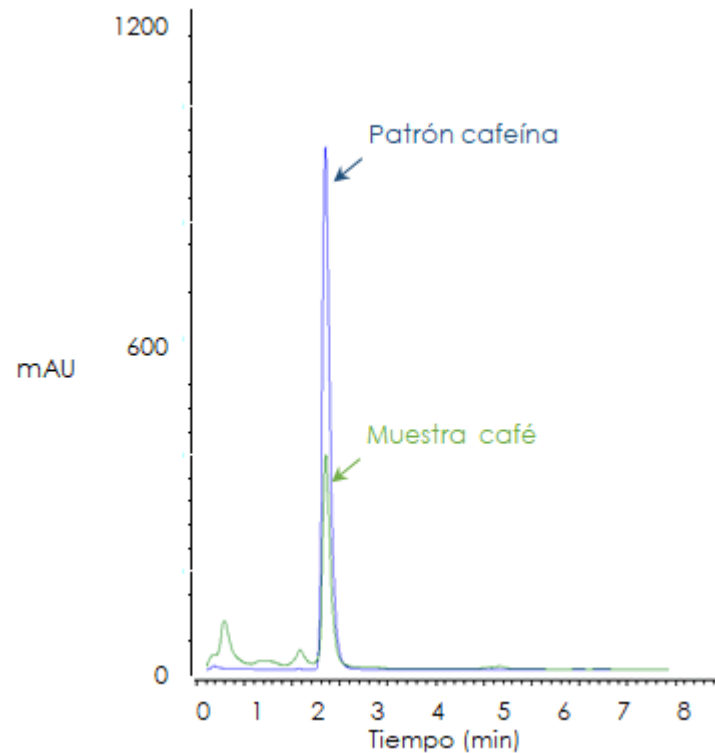


Figura 4. Cromatogramas de la disolución patrón de cafeína y de una muestra de café

La integración del pico correspondiente a la cafeína en ambas muestras nos permite obtener el valor del área para este analito. Sustituyendo el valor del área en la ecuación de calibrado podemos calcular la concentración de cafeína en los extractos inyectados en el cromatógrafo:

#### **Extracto de café molido natural**

$$\text{Área (y)} = 8700002 \rightarrow y = 221752x + 81560 \rightarrow \text{concentración (x)} = 38,86 \text{ mg/L}$$

#### **Extracto de café molido descafeinado**

$$\text{Área (y)} = 369586 \rightarrow y = 221752x + 81560 \rightarrow \text{concentración (x)} = 16,30 \text{ mg/L}$$

Para determinar la concentración de cafeína en las muestras analizadas tenemos que considerar el protocolo de preparación de la muestra y la dilución del extracto obtenido, si la dilución ha sido necesaria. En el caso del café descafeinado, el extracto obtenido se ha analizado directamente, mientras que en el caso del café sin descafeinar se ha realizado una dilución 1/10 del extracto original.

#### **Café molido natural**





$$\text{CAFEÍNA} = 39,29 \text{ mg/L} \times \left( \frac{0,020 \text{ L disolució}}{0,5 \text{ g muestra}} \right) \times \left( \frac{1 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}} \right) = 15,72 \text{ mg CAFEÍNA/g café}$$

### **Café molido descafeinado**

$$\text{CAFEÍNA} = 16,30 \text{ mg/L} \times \left( \frac{0,02 \text{ L disolució}}{0,5 \text{ g muestra}} \right) = 0,652 \text{ mg CAFEÍNA/g café}$$

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el contenido en cafeína de los diferentes tipos de café está regulado en la legislación [4]. En el caso de los cafés de tueste natural sin descafeinar, el contenido en cafeína no podrá ser inferior al 0,7% (expresado en materia seca), mientras que el máximo establecido para los cafés descafeinados es de 0,1% (en base seca).

El contenido en humedad de los cafés analizados se ha establecido en un 4%, por lo que la concentración de cafeína expresada en materia seca de las muestras analizadas es 1,63% y 0,069% para el café convencional y el descafeinado, respectivamente. A partir de los valores obtenidos en esta determinación para las muestras de café analizadas, se puede concluir que estas muestras cumplen con los requisitos establecidos en la legislación.

## **5 Cierre**

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto cómo llevar a cabo la determinación analítica de cafeína en café empleando la técnica de HPLC. Con ayuda de un ejemplo, hemos visto cómo identificar y cuantificar la concentración de cafeína en dos muestras de café diferentes, una café sin descafeinar y una café descafeinado.

## **6 Bibliografía**

[1] Instituto Químico Biológico. Vademecum. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c003.htm>.

[2] Hečimović I.; Belščak-Cvitanović, A.; Horžić, D.; Komes, D. (2011) Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. Food Chemistry, 129, 991-1000.

[3] ISO 20481:2011. Café y productos del café. Determinación del contenido de cafeína Usando cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Método de referencia.

[4] BOE (2012). Real Decreto 1676/2012, de 14 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad para el café.