

Extracción y cuantificación de cafeína en diferentes bebidas empleando HPLC

Espinoza-Tapia Julio César¹, Rivera-Becerril Ernesto², Hernández-Martínez Ingrid³,
Rodríguez-López Miguel³, Cruz-Rangel Rita Carolina³, Viguera-Ramírez Juan Gabriel^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana – Cuajimalpa, Departamento de Procesos y Tecnología. Av. Vasco de Quiroga No. 4871, Col. Santa Fé, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05348, México.

²Universidad Autónoma Metropolitana – Cuajimalpa, Departamento de Ciencias Naturales. Av. Vasco de Quiroga No. 4871, Col. Santa Fé, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05348, México.

³Universidad Autónoma Metropolitana – Cuajimalpa, Posgrado de Ciencias Naturales. Av. Vasco de Quiroga No. 4871 Col. Santa Fé, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05348, México.

*Autor para correspondencia: jviguera@correo.cua.uam.mx

Recibido:

31/mayo/2018

Aceptado:

8/agosto/2018

Palabras clave:

Cromatografía,
Cafeína,
HPLC

Keywords:

Chromatography,
Caffeine,
HPLC

RESUMEN

En el presente trabajo, se realizó la extracción y cuantificación de cafeína de 5 diferentes bebidas comerciales y un medicamento, las cuales fueron: café soluble, té negro, Coca-Cola®, y dos bebidas energizantes: Red Bull® y Vive 100®, así como tabletas de Cafiaspirina®. Se recurrió a la técnica de cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) y un estándar de cafeína para la identificación del compuesto en las muestras antes mencionadas, y se cuantificó la presencia de este alcaloide en cada una de las muestras analizadas. De acuerdo con los resultados experimentales obtenidos se encontró que de las bebidas analizadas Vive 100® debería ser considerado como una bebida adicionada con cafeína y no solo como energizante.

ABSTRACT

In the present work, the extraction and quantification of caffeine of 5 different commercial drinks and a medicine were carried out, which were: soluble coffee, black tea, Coca-Cola®, and two energy drinks: Red Bull® and Vive 100®, as well as Cafiaspirin® tablets. The technique of high pressure liquid chromatography (HPLC) and a caffeine standard were used for the identification of the compound in the aforementioned samples, and the presence of this alkaloid was quantified in each of the samples analyzed. According to the experimental results obtained, it was found that of the analyzed beverages Vive 100® should be considered as a beverage added with caffeine and not only as an energizer.

Introducción

La cafeína es un alcaloide presente en más de 60 especies de plantas y también es conocida de forma sistemática como 1,3,7-trimetilxantina y se encuentra presente en diversas fuentes alimenticias, y las más comunes son el café, el té, el chocolate y las bebidas derivadas de la cola. La cantidad de cafeína presente en las diversas bebidas varía en base a la especie de la planta de donde se origine, el tipo de grano de café, cacao u hoja de té, la ubicación geográfica, el clima de la región de donde se obtenga. En la Figura 1 siguiente se muestra la fórmula desarrollada de la 1,3,7-trimetilxantina.

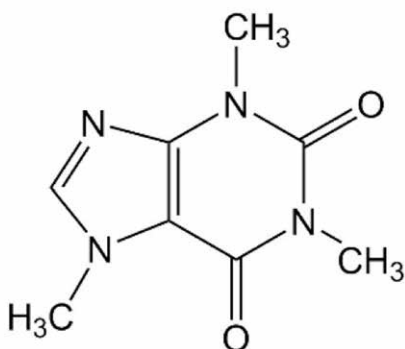


Figura 1. Fórmula desarrollada de la cafeína.

Hoy en día algunas de las bebidas que se utilizan como principales fuentes de cafeína son el café, el té, los chocolates y los refrescos de cola, entre otros; las cuales son consumidas por personas de casi todas las edades y estratos socioeconómicos. Por costumbre se les ha llamado bebidas energizantes, aunque lo que provocan no es energía sino un estímulo psicoactivo provocado por el golpe de cafeína y otras sustancias que “despiertan” al organismo.

Las concentraciones de cafeína promedio reportadas en algunas de las bebidas antes mencionadas son las siguientes (Lozano *et al.*, 2007):

- La semilla de **café** madura con el proceso de desecado de la planta; la dosis de cafeína depende de las diferencias genéticas de los granos, así como del tiempo y la forma de preparación, oscilando entre 30 y 175 mg por cada 150 ml.
- El **té** es considerado como el segundo producto en contenido de cafeína, que en sí es la hoja desecada de los arbustos de *Camellia* o *Thea sinensis*, *bohea* o *viridis*. Existen cuatro tipos distintos de té: él té verde (no fermentado), té negro (fermentado), té rojo (semifermentado), además del té blanco. La

concentración oscila entre los 20 y 73 mg por cada 100 ml, según el método de elaboración y el tiempo de extracción.

- Las plantas como el **guaraná** (pasta desecada de las semillas de *Paullina cupana*), el **mate** (hoja desecada de la hierba *Ilex paraguayensis*), la cola (semilla desecada de *Cola nitida*) y el yoco también contienen cafeína (alrededor de 2-4%).
- Las **bebidas energéticas** suelen presentar mayor contenido en cafeína que los refrescos. Por ejemplo, el Red Bull® contiene 80 mg de cafeína en 250 ml.
- Algunos **medicamentos** también contienen cafeína. Los contenidos oscilan habitualmente entre 15 y 200 mg, siendo mayor la dosis en los que no precisan receta.

Para lograr extraer y purificar la cafeína en cada uno de los productos antes mencionados, se aprovecha una de las propiedades fisicoquímicas que presenta este alcaloide, la sublimación que es un proceso en el cual las sustancias en estado sólido pasan al estado gaseoso sin pasar por estado líquido. Esta propiedad fisicoquímica es muy utilizada para la separación y purificación de sustancias orgánicas, esto debido a que diversas moléculas no presentan esta propiedad (Constenla y Mata, 1978).

La cafeína contiene una elevada presión de vapor, es decir, sus atracciones intermoleculares en estado sólido son débiles y le permiten sublimar, debido a esto puede separarse por este proceso. El calor de sublimación de una sustancia es la cantidad de calor necesaria para pasar a la fase vapor una unidad de masa de dicha sustancia a una determinada temperatura que es igual a la suma de su calor de fusión y vaporización a esta temperatura (Daly, 2007).

Otro método de separación es a partir de extracción líquido-líquido; una técnica de separación que implica dos fases líquidas inmiscibles entre sí; la cual es un proceso que se basa en la transferencia de una o varias sustancias, de una fase líquida a otra fase también líquida, de acuerdo con sus solubilidades estas sustancias se particionan entre los dos disolventes prevaleciendo en mayor proporción en aquel en el que sea más soluble (Domínguez, 1980).

Este tipo de extracción es muy amplio no solo como técnica de separación, sino también en otros aspectos, porque en esta técnica se pueden emplear combinaciones de dos o más disolventes orgánicos inmiscibles, generalmente una fase acuosa y otra orgánica; la fase

acuosa, suele ser la que contiene el soluto o mezcla de solutos a separar, así como ácidos y sales inorgánicas o incluso, sustancias orgánicas. La fase orgánica es la que permite la separación de los solutos mediante el contacto directo con la fase acuosa que inicialmente los contiene, a esta fase inmiscible con el agua se le denomina según la IUPAQ extradante, el cual puede ser un único disolvente orgánico, mezclas de disolventes o la disolución de una sustancia en un disolvente o una mezcla de disolventes (Fredholm *et al.*, 1999).

El uso de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es una herramienta analítica de alto rendimiento y precisión, utilizada para la separación de mezclas, además de la identificación y la cuantificación de los diferentes componentes que conformen dicha mezcla (Bird, 1989). Dicho proceso de separación se realiza mediante el uso de un disolvente que fluye a través de una columna de separación, el cual es forzado a circular a elevadas presiones para lograr la separación de los diferentes constituyentes la muestra de análisis y recurriendo a la diferencia de afinidades relativas de los compuestos (Thammana, 2016).

El presente trabajo tiene los siguientes objetivos: primero el corroborar la presencia de la cafeína en diferentes bebidas comerciales, en segundo cuantificar la presencia de esta sustancia debido al efecto que esta genera dentro del organismo, y por último conocer cuáles de estas son las que, al provocar el estímulo psicoactivo por el golpe de cafeína y otras sustancias, que provocarían secuelas al organismo a un largo plazo por el consumo excesivo de dichas bebidas.

Metodología

El procedimiento experimental desarrollado está dividido en varias etapas, en un primer paso se requiere de una preparación de las muestras, posteriormente se someten a una destilación a vacío, después se realiza la separación de la cafeína por sublimación, para finalizar con el análisis cromatográfico de las muestras; los cuales se describen a continuación:

Preparación de las muestras

Para las muestras de Café, té negro, Vive 100®, Coca-Cola®, RedBull®, Cafiaspirinas®; se realizó la siguiente metodología:

a) Para cada una de las muestras se pesaron las siguientes cantidades: café: 6.7684 g, té: 6.7681 g y en el caso de las bebidas: Red Bull®: 250 mL, Coca Cola®: 200 mL y Vive100®: 200 mL a las cuales se les eliminó la mayor

cantidad de gas. Posteriormente el volumen se vertió en un embudo de decantación y se realizaron 3 extracciones añadiendo 50 mL de cloroformo (3x50 mL), este proceso que se realizó por triplicado.

En el caso del café y el té negro, por separado, se suspendieron en 30 mL de una solución 0.1 M de hidróxido de sodio (NaOH), posteriormente las fases acuosas fueron transferidas a un embudo de decantación y se realizaron extracciones con cloroformo (3x50 mL). Todas las mezclas se agitaron vigorosamente en forma circular para favorecer que la fase orgánica se intercalara con la fase acuosa y lograr la extracción de la cafeína.



Figura 2. Extracción de cafeína a partir de las muestras de Coca-Cola® y Red Bull®.

b) Cafiaspirina®: Se trituraron 10 tabletas en un mortero (6.5328 g), posteriormente se añadieron 50 mL de cloroformo y bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido acetilsalicílico y permaneciera en la fase acuosa favoreciendo la extracción del alcaloide. Se dejó reposar para que la mayor cantidad de excipientes precipitara, y se filtró dos veces para eliminar los contaminantes, después se hicieron extracciones con cloroformo para obtener la mayor cantidad de cafeína dado que esta es soluble en este disolvente orgánico.

Destilación a vacío de las muestras

Los extractos obtenidos se secaron empleando sulfato de sodio anhidro y se colocaron en matraces redondos de destilación para posteriormente por medio de un rota vapor, eliminar el disolvente por evaporación a vacío.

Separación de cafeína por sublimación

A los matraces con los sólidos obtenidos se les colocó un dedo frío conectado a un sistema de recirculación de agua

y utilizando una lámpara de alcohol se inició el proceso de sublimación de la cafeína. El matraz se movió de forma circular, de tal forma que el calor se dispersara por toda la superficie del matraz.

Análisis cromatográfico (HPLC)

Para el análisis se utilizó un equipo HPLC Varian ProStar, y se estableció un flujo de 1 mL/min, a una temperatura ambiente (25 °C), se manejó un volumen de inyección de 20 µL, una presión ~ 1900 psi y se manejó una elución isocrática; adicionalmente se utilizó un detector de UV a una longitud 254 nm.

Se utilizó una columna cromatográfica Simmetry C18, de 100 Å, 3.5 µm con dimensiones de 4.6 X 75 mm. Estas columnas presentan ligandos C18 monofuncionalmente unidos en sílice de alta pureza desactivada en la base. La fase móvil agua – metanol con relación 70:30, se preparó siguiendo los siguientes pasos mostrados en la Figura 3:



Figura 3. Esquema de la preparación para fase móvil.

Se prepararon 10 mL de una disolución stock con una concentración de 0.88 mg/mL, a partir de ella se hicieron cuatro diluciones; 10:90, 25:75, 50:50 y 75:25. Para conocer la concentración de cada dilución se utilizó la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$:

$$C_1 = 0.88 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}, \quad V_1 = 100\mu\text{L}, \quad V_2 = 1000\mu\text{L},$$

$$C_2 = \frac{\left(0.88 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)(100\mu\text{L})}{(1000\mu\text{L})} = 0.088 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ de cafeína}$$

Siguiendo el mismo procedimiento se determinaron las concentraciones para el resto de las diluciones. La cafeína extraída de cada una de las muestras se disolvió en la fase móvil, se pesó aproximadamente 1 mg y se disolvió en 1 mL, posteriormente se hizo una dilución 1:10 y se hizo

un paso de filtración con membranas de 0.22 µm. Cada uno de los puntos de la curva de calibración (cuatro), así como de las muestras (seis) se inyectaron en una ocasión.

Resultados y discusión

Curva de calibración

En base a los datos obtenidos por los cromatogramas de cada punto de la curva de calibración se obtuvo la siguiente gráfica.

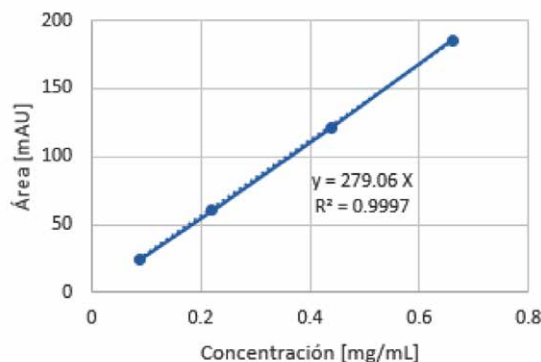


Figura 4. Curva de calibración del estándar de cafeína.

La información arrojada por los cromatogramas del estándar de cafeína (Concentración vs Área) nos proporciona la información necesaria para contar con la herramienta que nos permite cuantificar la cafeína presente en cada bebida. Por lo cual se construyó la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1. Datos obtenidos por la curva de calibración.

Concentración [mg/mL]	Área [mAU]
0.088	23.8
0.22	60.3
0.44	121.5
0.66	185.5

Con los datos anteriores y recurriendo a la expresión obtenida en la curva de calibración y considerando que el incremento en la concentración de cafeína mantiene un comportamiento lineal al área bajo la curva, se recurrió a la siguiente ecuación para determinar la concentración de cafeína de cada muestra analizada.

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{(\text{Área})}{m}$$

Después de realizados los análisis cromatográficos de cada muestra se analizaron los resultados obtenidos y la información arrojada se sintetiza en la Tabla 2 que se muestra a continuación:

Tabla 2. Información obtenida por HPLC para la cuantificación de cafeína en las distintas muestras analizadas.

Muestra	Área [mAU]	Concentración [mg/mL]
Vive 100 ®	13.4	0.48018347
Té negro ®	24.6	0.88153085
Coca - Cola ®	18.8	0.67369025
RedBull ®	25.8	0.92453236
Café soluble Nescafé®	17.9	0.64143912
Cafiaspirina ®	29.2	1.04636996

Con la información observada en la Tabla 2, se comprueba en un primer caso la presencia de la molécula de cafeína en las bebidas seleccionadas para el análisis, así como en el fármaco analizado, posteriormente es posible confirmar que la concentración (mg/mL) de las bebidas es semejante (claro con sus marcadas excepciones como fue el Red Bull), y además que la presencia en el fármaco fue mucho mayor que en las bebidas analizadas. De igual manera se corrobora que el consumir un café nos proporcionaría prácticamente la misma dosis de cafeína que el consumir refresco (Coca-Cola).

Adicionalmente conociendo la proporción de cafeína presente en las muestras analizadas se procedió a comparar la información reportada en la literatura (Lozano et al., 2007) y con la información proporcionada por cada proveedor. Los datos se resumen en la Tabla 3.

Con lo cual se aprecia que las concentraciones determinadas por el análisis realizado en la mayoría de las muestras concuerdan con la concentración reportada previamente en la literatura (con excepción de las bebidas energéticas). La cantidad presente de este compuesto varía en función al proceso de elaboración, pero a su vez se mantiene dentro de un rango apropiado para cada tipo de bebida.

Tabla 3. Comparativa de las proporciones de cafeína de las muestras analizadas

Muestra	Cafeína reportada en el producto	Cafeína reportada (Lozano, 2007)	Cafeína determinada
Red Bull	18 mg / 100 mL	80mg / 250mL	17.4 mg / 100 mL
VIVE 100	32 mg / 100 mL	No reportado	34.8 mg / mL
Cafiaspirina	30 mg / tableta	15 y 200 mg / tableta	20.18 mg / tableta
Café soluble Nescafé	12 %	30 y 175 mg / 150 ml	13 %
Coca - Cola	8 mg / 100 mL	2-4 %	5.25 mg / 100 mL
Té negro	20 mg / 100 mL	20-73 mg /100 ml	22.67 mg / 100 mL

Conclusiones

De acuerdo con las normas oficiales mexicanas (NOM) las bebidas que presentan cafeína no deben de exceder 33 mg por cada 100 mL, por lo cual lo recomendable es el no consumir bebidas que excedan dicha concentración. Adicionalmente considerando las mismas normas las bebidas que exceden los 20 mg de cafeína se deben ostentar como bebidas adicionadas con cafeína, y finalmente cabe resaltar que también se hace mención que la dosis recomendada no debe de rebasar los 165 mg de cafeína al día.

De acuerdo con los resultados reportados en la literatura y los datos experimentales obtenidos, se puede observar que la bebida con mayor contenido es Vive 100, con 34.8 mg/mL y la bebida que presenta la menor es la Coca-Cola ® con 5.25 mg/100 mL. El consumo en exceso de estos productos puede generar problemas de salud, pero aún faltan más estudios al respecto.

Referencias

- Bird, I. (1989). High Performance Liquid Chromatography: principles and clinical applications. *BMJ*, 299 (6702), 783-787.
- Constenla, U. y Mata, J. (1978). *Química orgánica experimental*. San José: Litografía e Imprenta Lil, S. A.

Daly, JW. (2007). Caffeine analogs: biomedical impact. *Cell Mol Life Sci*, 64 (16), 2153–2169.

Domínguez, X. (1980). *Experimentos de Química orgánica*. México: Limusa.

Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehling, A., y Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev*, 51 (1), 83–133.

Goldstein, J., Silberstein, S. D., Saper, J. R., Ryan, R. E., Lipton, R. B. (2006). Acetaminophen, aspirin and caffeine in combination versus ibuprofen for acute migraine: results from a multicenter, double-blind, randomized, parallel-group, single-dose, placebo-controlled study. *Headache*, 46 (3), 444–453.

Gotteland, M. y de Pablo, S. (2007). Algunas verdades sobre el café. *Rev Chil Nutr*, 34 (2), 105–115.

Morrison, R., Boyd, R. (1990). *Química Orgánica*. Estados Unidos de América: Addison Wesley Iberoamericana.

Prado-Lozano, R., Álvarez-García, Y., Barral-Tafalla, D., y Farré-Albaladejo, M. (2007). Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*, 19 (3), 225–238.

Sawynok, J. (2011). Methylxanthines and pain. In: Methylxanthines. Handbook of Experimental Pharmacology (311–329). Berlín, Heidelberg: Springer.

Thammana, M. (2016). A review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5 (2), 22–28.