

## DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA EN BEBIDAS GASIFICADAS OSCURAS Y DETERMINACIÓN DE CASEÍNA EN LECHE. APLICACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DE SEGUNDA DERIVADA

Angélica Rodríguez B.

Unidad de Postgrado, Facultad de Química e Ingeniería Química,  
UNMSM, Av. Venezuela s/n., Ciudad Universitaria, Lima - Perú.

**Abstract:** It shows the use of 2<sup>nd</sup> Derivative Spectrophotometry to determine caffeine concentration in kola drinks, the direct determination is not possible due to the dark coloring, and the determination of casein in milk, a turbid sample; using for both standard addition method. The concentration of caffeine was 107ppm and 3% of casein.

**Key words:** Derivative spectrophotometry, caffeine, casein.

**Resumen:** Se muestra el uso de la Espectrofotometría de 2da derivada para determinar la concentración de cafeína en bebidas gasificadas oscuras, (la determinación directa no es posible debido al color intenso de la muestra) y la determinación de caseína en leche (muestra turbia), usando para ambos casos la técnica de adición de patrón. La concentración de cafeína fue de 107ppm y la de caseína, 3%.

**Palabras claves:** Espectrofotometría de Derivadas, cafeína, caseína.

### INTRODUCCIÓN

La espectroscopía de derivadas es una técnica de medida espectrofotométrica que desde su inicio a mediados de la década del 50, <sup>(1)</sup> cuando se usó para separar dos bandas de absorción con valores de longitud de onda muy cercanos, se ha aplicado a casi todas las áreas de la espectroscopía atómica y molecular, tanto en emisión como absorción. Debido a que permite una mejor resolución espectral, el método de las derivadas ha contribuido a la solución de problemas de interferencia <sup>(5)</sup> en la determinación de trazas <sup>(1,4)</sup> y de mezclas de sustancias <sup>(2,3)</sup>.

Este trabajo se presenta basado en la tesis para obtener el título de Químico presentado por la autora <sup>(7)</sup>.

### PARTE EXPERIMENTAL

Las aplicaciones de la espectroscopía de derivadas siguen las mismas pautas fundamentales de la Espectroscopía de absorción molecular en el UV-Visible, es decir, está sujeta a los efectos de los factores que afectan la absorción, tanto en los aspectos cualitativos como cuantitativos en el análisis.

#### Reactivos y materiales

Se han empleado los necesarios y de uso común en el laboratorio.

### Instrumentos

Espectrofotómetro UV-Vis, UV- 1601 (SHIMADZU, Tokio-Japón), controlado por computadora, que puede registrar de la 1ra a la 4ta derivada.

### Muestras y su Preparación

Para el análisis, el espectro de 2da derivada se aplica a sustancias que son altamente interferidas por turbidez, por el color intenso de la muestra o por su baja concentración. En este caso, se realizó la determinación de cafeína en bebidas gasificadas oscuras (cuyo color interfiere altamente), comprobando previamente la presencia de ésta en la muestra, y la determinación de caseína en la leche (efecto de turbidez producido por la emulsión de grasas)<sup>6</sup>, preparando estas muestras convenientemente.

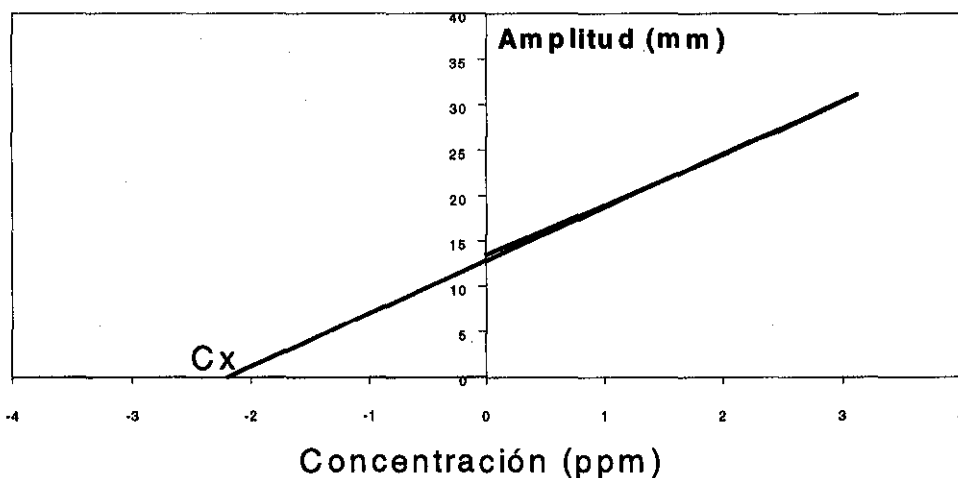
### Técnica

Como se conoce, el análisis cuantitativo es la aplicación de la ecuación de Lambert-Beer:  $A=abc$ , la que permite la cuantificación por medio de la comparación con patrones de concentración definida, a través del gráfico de Absorbancia vs. Concentración del patrón, que se preparan con una composición semejante a la muestra, que es la técnica normal más usual.

**TABLA I.** Determinación de cafeína en bebida gasificada oscura- Técnica por adición de patrón

Muestra: Bebida gasificada oscura, dilución 10: 100, (10.0 mL contienen 1.0 mL de gaseosa )				
Patrón: Estándar de referencia de cafeína USP, Sigma $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 272.80 Solución Patrón de Trabajo: 5 ppm				
Fiola (50.0 mL)	Solución muestra(mL) +	Patrón de Trabajo (mL)	Concentración patrón (ppm)	Amplitud (mm.)
$f_0$	solvente	0.00	0.00	blanco
$f_1$	10.00	10.00	1.00	19.00
$f_2$	10.00	20.00	2.00	24.50
$f_3$	10.00	30.00	3.00	30.50
$f_m$	10.00	0.00	$C_x = 2.20$	13.50

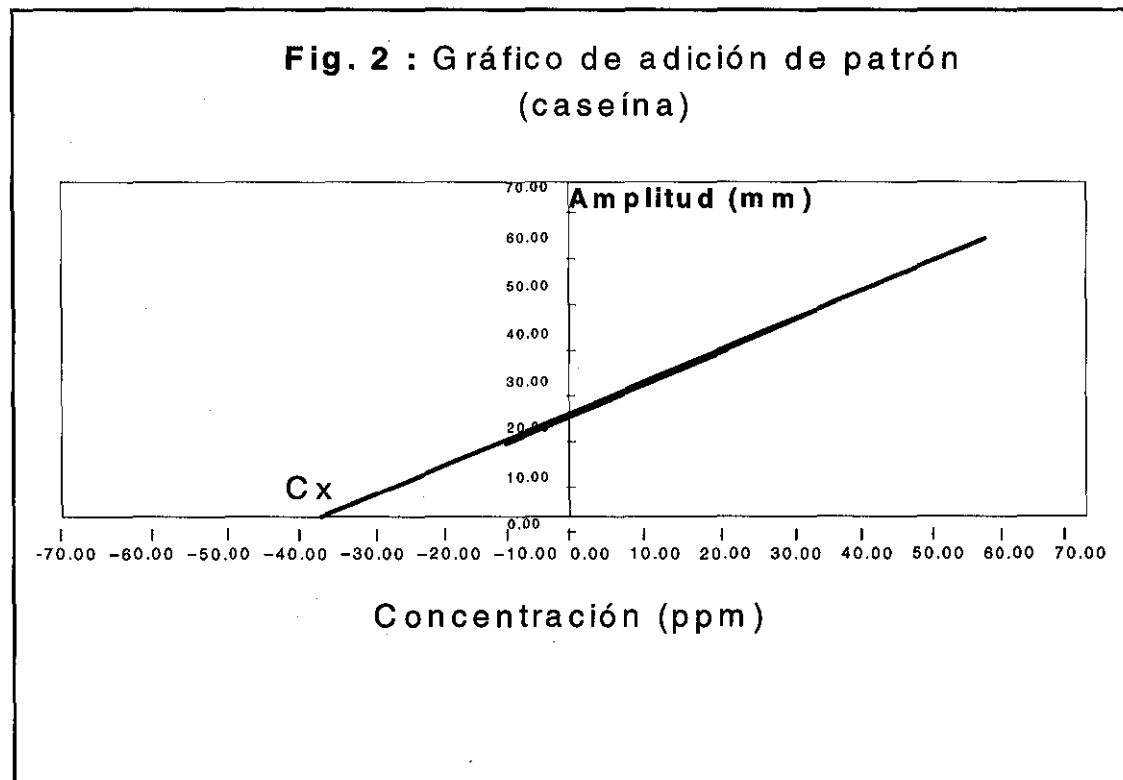
**Fig. 1 :** Gráfico de adición de patrón  
(cafeína)



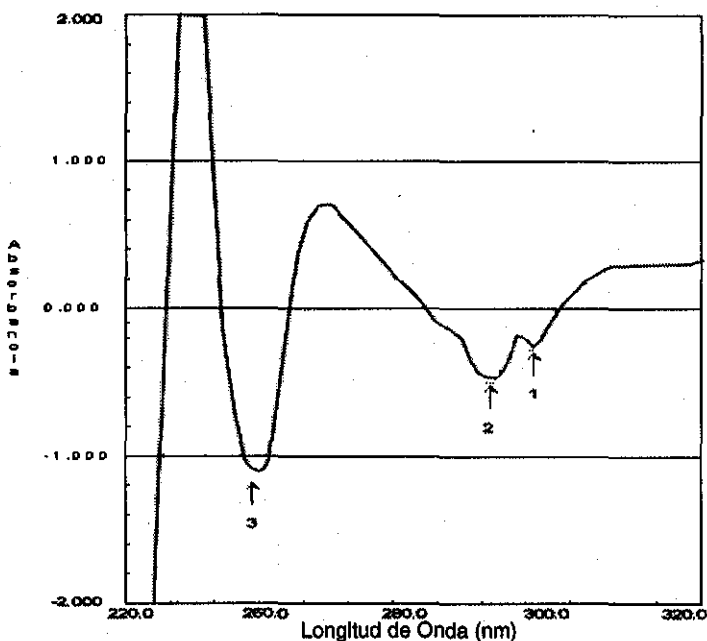
**TABLA II.** Determinación de caseína en leche fresca - técnica por adición de patrón

Muestra: Leche fresca, dilución 10: 100 (1.0 mL contienen 0,1 mL de leche )				
Patrón: Estándar de referencia de caseína, Merck $\lambda_{\text{máx}}$ : 290,80 Solución Patrón de Trabajo: 1000 ppm				
Fiola (100,0 mL)	Solución muestra(mL) +	Patrón de Trabajo (mL)	Concentración patrón (ppm)	Amplitud (mm.)
$f_0$	solvente	0,00	0,00	blanco
$f_1$	1,00	2,00	20,00	34,50
$f_2$	1,00	4,00	40,00	48,00
$f_3$	1,00	6,00	60,00	60,50
$f_m$	1,00	0,00	$C_x = 33$	22,00

**Fig. 2 :** Gráfico de adición de patrón  
(caseína)



**FIG. B. ESPECTRO 2DA DERIVADA DEL PATRÓN DE CASEÍNA (500 PPM)**

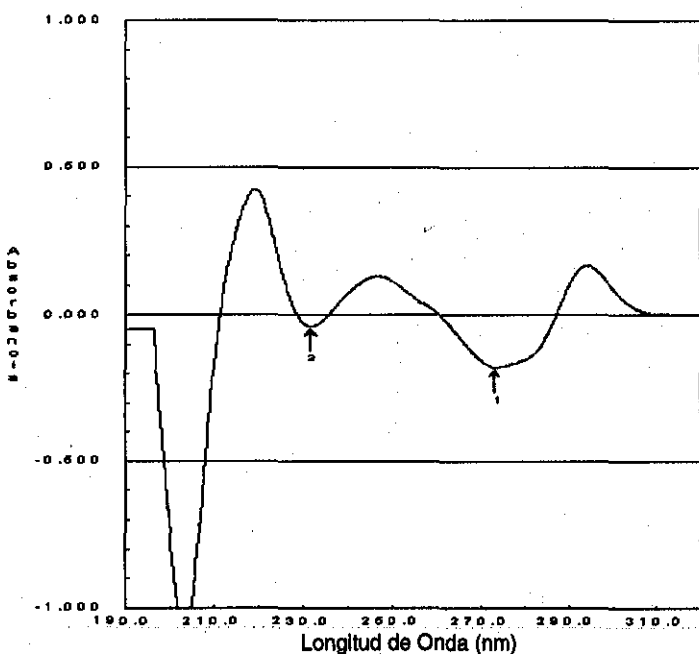


Espectro de la 2da derivada

No.	Long. de onda (nm)	A.
1	300.20	-0.168
2	290.80	-0.328
3	247.00	-1.108

\_\_\_ Espectro 2da derivada

**FIG. A. ESPECTRO 2DA DERIVADA DEL PATRÓN DE CAFÉINA (5PPM)**



Espectro de la 2da derivada

No.	Long. de onda (nm)	A.
1	279.20	-0.177
2	231.80	-0.038
3	203.40	-1.081

\_\_\_ Espectro 2da derivada

Sin embargo, en esta aplicación, considerando la naturaleza de las muestras y sus características difíciles de reproducir, esta ecuación se aplica empleando la técnica de adición de patrón; que básicamente consiste en tomar alícuotas iguales de muestra (4) y adicionarle a 3 de ellas diferentes concentraciones del analito. Luego se realizan los registros y medidas.

La tabla I y la Fig. 1 muestran en forma objetiva la técnica, así como el valor  $C_x$  correspondien-

te a la muestra de cafeína y la tabla II y la Fig.2 y  $C_x$  para la muestra de caseína.

Se debe mencionar que los valores de Absorbancia empleados, se han encontrado por la técnica de la Línea Base, que se emplea debido al fraccionamiento de la banda, por la polaridad del espectro y sobre todo cuando la banda no es simétrica.

**a) Determinación de cafeína en bebida gasificada oscura**

**Preparación de muestras y patrones**

*Patrón Base (concentración 500 ppm).* Pesar 0,050 g de estándar de referencia de cafeína USP, Sigma y llevar a volumen con agua destilada en fiola de 100mL.

*Solución Patrón de trabajo (5 ppm).* - *Solución muestra.* La bebida gasificada fue desgasificada hasta absorbancia constante, con un equipo de vacío (presión 40 psi) y un agitador magnético. Tomar 10,0 mL de solución muestra desgasificada y llevar a volumen con agua destilada en fiola de 100,0 mL. Para la solución muestra se tomaron 10,0 mL de esta solución y se llevó a volumen en fiola de 50,0 mL.

*Registro de espectros y parámetros.* Las muestras en solución, tal como se han preparado se colocan en la celda de absorción y se procede al registro. En primer lugar, se registró el espectro normal (orden cero) y después la 2da derivada. Rango de 190 a 320 nm. ; A de -2 a 2;  $\Delta\lambda = 8$  y factor de escala = 130.

**b) Determinación de caseína en leche fresca**

**Preparación de muestras y patrones**

*Patrón Base (concentración 1000 ppm).* Pesar 0,1g del estándar de referencia de caseína, Merck, disolver con agitación constante utilizando NaOH 0,025N y llevar a volumen en una fiola de 100,0 mL .

*Solución Muestra de Trabajo.* Tomar 10,0 mL de leche y disolver con NaOH 0,025N y llevar a volumen en fiola de 100,0 mL. Para la solución muestra se tomó 1,0 mL de esta solución y se llevó a volumen en fiola de 100 mL con NaOH 0,025N.

*Registro de espectros y parámetros.* Las muestras en solución, tal como se han preparado, se colocan en la celda de absorción y se procede al registro. En primer lugar se registró el espectro normal (orden cero) y después la 2da derivada. Rango de 220 a 320 nm. ; A de -2 a 2;  $\Delta\lambda = 8$  y factor de escala = 1300.

**PRESENTACIÓN DE DATOS Y GRÁFICOS OBTENIDOS**

Los resultados y los gráficos obtenidos se muestran en las Tablas I y II y las figuras A y B muestran el espectro de 2da derivada de los estándares de cafeína y caseína respectivamente.

**Cálculos**

a) Determinación de cafeína en Bebida gasificada oscura: se realizó por triplicado.

Vol. de fiola (mL) 50	Vol. muestra	C <sub>x</sub> ppm
1	2,2	= 110 ppm

C <sub>x</sub> (del gráfico)	Conc. de muestra (ppm)
2,2	110
2,1	105
2,1	105
	Prom. = 107 ppm

La muestra de bebida gasificada oscura tiene 107 ppm de cafeína.

Desviación Estándar ( $\delta$ ):

$d_1 = 3,30$

$d_2 = 1,70$

$d_3 = 1,70$

$\delta = 2,04$

b) Determinación de caseína en leche fresca : se realizó por triplicado.

Vol. fiola (mL)	Vol. muestra (mL)	C <sub>x</sub> ( ppm)
100	0,1	33

100 mL x 34 = 0,1 mL x ppm  
 = 33,000 ppm  
 = 33 g/L

En porcentaje (%) = 3,30 %

C <sub>x</sub> (del gráfico)	Conc. de muestra (%)
33	3,3
34	3,4
34	3,4
	Promedio = 3,0%

La muestra de leche tiene 3,0% de caseína.

Desviación Estándar ( $\delta$ ):

$d_1 = 0,07$

$d_2 = 0,03$

$d_3 = 0,03$

$\delta = 0,06$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo de la cafeína en bebida gasificada oscura de 107 ppm, así como el de la caseína en leche fresca de 3,0% por la técnica empleada, permite apreciar los alcances de la 2da derivada, aplicados a estos tipos de muestra. Aunque no se tiene una referencia para el caso de la cafeína en gaseosa oscura, para la caseína en la leche, el valor obtenido es del 3%, que es lo que contiene la leche.

Estos análisis fueron realizados por triplicado en cada caso, para asegurar que los resultados son aceptables y no presentan desviaciones apreciables. La desviación estándar para la cafeína fue:

$\delta = 2,04$  y para la caseína  $\delta = 0,06$

Por otra parte, como se puede apreciar por los gráficos  $A_m$  vs. Concentración, en ambos casos se observa una linealidad que indica que los sistemas obedecen a la Ley de Lambert-Beer, lo que refuerza la validez de los resultados.

## CONCLUSIONES

1. En los análisis de las muestras seleccionadas, por las técnicas conocidas, se requiere un tratamiento previo, que es largo y tedioso;

pero, como se aprecia, es simplificado por la espectrofotometría de 2da derivada en la medida de absorción.

2. Por otro lado, no hay dificultad en la aplicación de la Ley de Lambert - Beer, como se puede observar, por la linealidad de los gráficos A vs Concentración.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Hager Jr., R. N., *Anal. Chem.*, **45**, 1131a (1973).
- [2] Tahboub, Y. R., Pardum, H. L., *Anal. Chem.*, **57**, 38 (1985).
- [3] Olson, E. C., Alway, C. D., *Anal. Chem.*, **32**, 70 (1960).
- [4] Strojcek, J. W., Yates, D., y Kuwana, T., *Anal. Chem.*, **47**, (1975).
- [5] Lepine, L., Gilbert, R., y Belanger, G., *Anal. Chem.*, **58**, 1152, (1986).
- [6] Schmitt, A. - Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA, *Derivative Spectroscopy*, Order L-645 (1977).
- [7] Rodriguez, A., *Tesis para optar el Título profesional de Químico*. (UNMSM) 1999.