

## Protokoll:

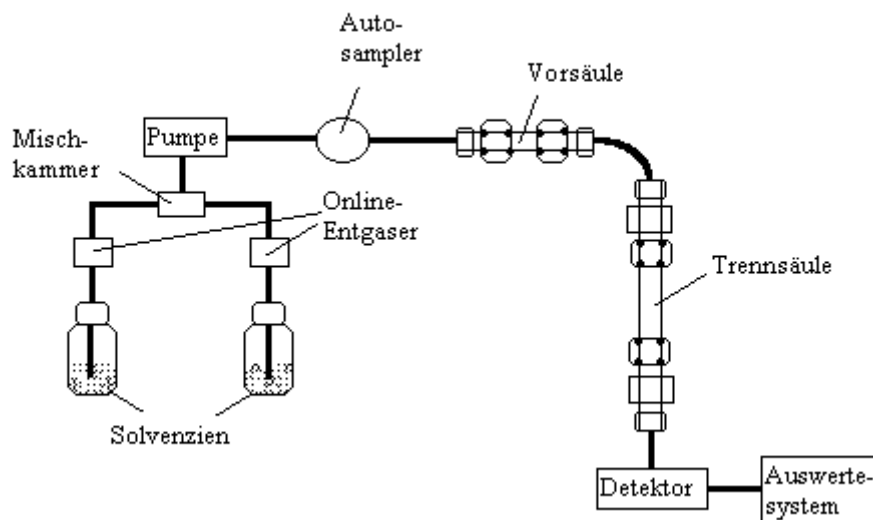
### Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

#### Zielstellung:

- Bestimmung der Retentionszeiten von Theobromin, Theophyllin und Coffein!
- Ermittlung des Coffeingehalts verschiedener Nahrungs- und Genussmittel und Verwendung einer Kalibrierung mit einem inneren Standard, welcher nach analytischen Gesichtspunkten ausgewählt wird!
- Bestimmung der Totzeit und einiger Leistungsparameter der verwendeten Säule!

#### Methoden:

- die verwendete HPLC-Anlage arbeitet nach dem Prinzip des Niederdruckgradienten, d.h. die Lösungsmittel werden vor dem Pumpenkopf unter Normaldruck gemischt
- Entgasung der Lösungsmittel erfolgt mit einem Online-Entgaser



- verwendete Säule:
  - RP18-Säule
  - Partikelgröße: 4  $\mu\text{m}$
  - Porengröße: 100  $\text{\AA}$
  - Säulenlänge: 125 mm
  - Innendurchmesser: 2 mm
- Vorsäule:
  - gleiches Füllmaterial wie in Trennsäule
  - Säulenlänge: 20 mm
  - Innendurchmesser: 2 mm
- die Detektion erfolgt mit einem Diodenarraydetektor (DAD)
- die Signalintensitäten an ausgewählten Wellenlängen werden zur Bestimmung der Gehalte genutzt
- für die quantitative Auswertung soll für Coffein und den inneren Standard die gleiche Wellenlänge genutzt werden

## **Versuchdurchführung / Auswertung:**

- je nach Aufgabenstellung werden die verschiedenen Lösungen wie angegeben hergestellt
- benötigt werden jeweils 1-1,5 mL Lösung
- diese wird in ein Probeial eingefüllt und durch ein Septum verschlossen
- danach werden die Proben in den vorgesehenen Platz in den Autosampler gestellt

### **Bestimmung der Totzeit der Säule:**

- eingesetzter Stoff: Thioharnstoff
- dabei handelt es sich um einen stark polaren Stoff
- dieser geht kaum (bis keine) Wechselwirkungen mit der unpolen stationären Phase ein und gelangt somit annähernd genauso schnell durch die Säule, wie die eingesetzte mobile Phase (Methanol : Wasser – 28 : 72)
- zur Messung wird aus der ausstehenden Lösung mit einer Konzentration von 100 mg/L eine Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/L hergestellt
- die Messung wird 3x wiederholt
- die Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 235 nm, da hier der Thioharnstoff das beste Ansprechverhalten zeigt
- Bestimmung der Totzeit siehe Teil Messwerte / Berechnungen

### **Aufnahme der Chromatogramme der Naturstoffe:**

- nach der Bestimmung der Totzeit werden Chromatogramme der Naturstoffe Theobromin und Theophyllin als reine Lösungen und einer Mischung aus Theobromin, Theophyllin und Coffein aufgenommen
- dazu werden die ausstehenden Lösungen, die eine Konzentration von 100 mg/L haben auf das 20fache verdünnt ( $c = 5 \text{ mg/L}$ )
- bei der Messung des Naturstoffgemischs wurde nur eine Konzentration von jeweils 1,7 mg/L verwendet
  - woraufhin die Peaks auch nur ein Drittel der Fläche im Vergleich zum Reinstoff aufweisen sollten
- diese Stoffe wurden bei einer Wellenlänge von 275 nm ausgewertet, welche für alle weiteren Messungen beibehalten wurde
  - alle drei Stoffe zeigen bei dieser Wellenlänge ein Maximum im UV-Spektrum

### **Messung der Cola-Probe:**

- zur Aufnahme der Cola-Probe wurde die ausstehende Cola (Coca-Cola) 20fach mit Wasser verdünnt
- in dem Chromatogramm sind alle Peaks zu sehen, die auch in den Realproben zu erwarten sind

### **Festlegung des inneren Standards:**

- aus den ausstehenden Lösungen soll ein geeigneter innerer Standard ausgewählt werden
- dieser muss zur Bestimmung von Coffein in den Proben geeignet sein
  
- Anforderungen an den inneren Standard:
  - ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften, wie der zu bestimmende Stoff (ähnliche Siedepunkte, Verdunstungseigenschaften, Wechselwirkungen)
  - muss einen gut abgetrennten Peak haben (darf nicht in Peaks anderer zu untersuchender Stoffe übergehen) und nicht zu weit von dem Probepeak entfernt sein

→ Verringerung von Fehlern bei der Probenvorbereitung (Erhitzen, Lösen, ...) da bei dieser Methode nur das Konzentrationsverhältnis von Analyt zu Standard betrachtet wird

- wir verwenden Theophyllin, da dieser Stoff einen gut getrennten Peak zeigt
- Theobromin scheidet als innerer Standard aus, da dieser Peak (bei den gewählten Versuchsbedingungen) nicht eindeutig vom Peak der Totzeit getrennt ist, was wiederum zu Fehlern in der Flächenintegration und somit zu Konzentrationsfehlern führt

### **Herstellung und Messung der Kalibrierlösungen:**

- insgesamt sind fünf Kalibrierlösungen mit den Konzentrationen 2, 4, 6, 8 und 10 mg/L Coffein herzustellen
- dazu wird die entsprechende Menge von der ausstehenden Coffein-Lösung ( $c = 100 \text{ mg/L}$ ) abgemessen und in die Vials gegeben
- hinzugegeben wird jeweils eine Lösung aus 5 mg/L des inneren Standards
- anschließend wird mit Wasser verdünnt, im Vial vermischt und chromatografiert

### **Probenvorbereitung und Messung der Probelösungen:**

- von den pulverförmigen Proben werden 1 g (Onko-Kaffee und Kakao-Pulver) bzw. 2 g (Jakobs koffeinfreier Kaffee) eingewogen
- diese Proben werden jeweils mit 25 mL Lösung des inneren Standards mit einer Konzentration von 500 mg/L versetzt
- diese Mischungen auf der Heizplatte kurz aufkochen, dabei mit Uhrglas abdecken, um die Volumenveränderung zu minimieren
- einen sehr kleinen Teil dieser Ansätze durch einen Feinfilter (45  $\mu\text{m}$ -Filter) geben und abkühlen lassen
- die Filtrate mit Wasser 100fach verdünnen auf 1 mL

### **Messwerte / Berechnungen / theoretische Überlegungen:**

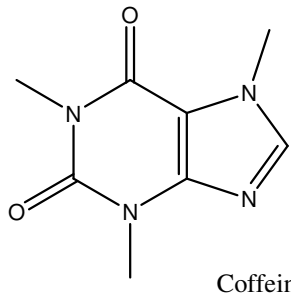
#### **Bestimmung der Totzeit:**

- folgende Werte ergaben sich bei Benutzung von Thioharnstoff für die Totzeit (Dreifach-Bestimmung):
  - 1. Messung 1,631 min
  - 2. Messung 1,631 min
  - 3. Messung 1,631 min
- das Ergebnis zeigt, dass es sich um eine gut reproduzierbare Methode handelt, wenn die gewählten Parameter übereinstimmen
- zugehöriges Chromatogramm im Anhang (Totzeit)
- hierbei handelt es sich um die experimentell bestimmte Totzeit
- die wahre Totzeit liegt deutlich weiter vorn im Chromatogramm
- die Abweichung kommt dadurch zu Stande, dass erst die Thioharnstoff-Moleküle die freien Poren besetzen müssen und erst wenn alle Poren besetzt sind, gelangen die Moleküle ungehindert durch die Säule

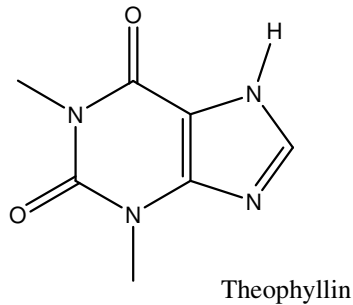
#### **Retentionsreihenfolge:**

- folgende Retentionsreihenfolge der betrachteten Naturstoffe ist zu erwarten und zeigte sich auch im Chromatogramm:
  - Theobromin → Theophyllin → Coffein
  - Trennung erfolgt auf Grundlage der unterschiedlichen Polaritäten der einzelnen Stoffe

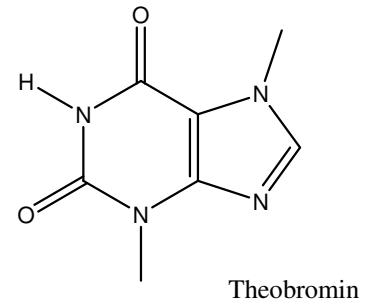
- bei der verwendeten Umkehrphasen-Chromatographie ist die stationäre Phase unpolar
- damit treten die stärksten Wechselwirkungen der stationären Phase mit unpolaren Stoffen auf



- findet sich in Kaffeebohnen, im schwarzen Tee, in Mate-Tee, in Cola und Kakaobohnen
- anregenden Wirkung auf Herzfähigkeit, Stoffwechsel, Atmung, Blutdruck



- Alkaloid aus Blättern des Teestrauchs
- verstärkt die Kontraktion des Herzmuskels
- Stimulierung des Zentralnervensystems ähnlich des Coffeins



- Hauptalkaloid des Kakaos
- wird hauptsächlich aus Schalen der Kakaobohne gewonnen
- wirkt gefäßerweiternd und anregend auf den Herzmuskel
- schwächere Wirkung als die des Coffeins

- der unpolarste Stoff wird also am stärksten und längsten zurückgehalten und zeigt somit die längste Retentionszeit
- bei den von uns betrachteten Stoffen ist Coffein unpolarer als Theophyllin und dieses wiederum unpolarer als Theobromin

#### Messung der Naturstoffe:

- in den Chromatogrammen sind die deutlichen Peaks der einzelnen Stoffe zu erkennen
- man erkennt, dass die Peaks von Theobromin und Theophyllin bei gleicher Konzentration ähnlich hohe Peaks zeigen
- dadurch können wir den Theobromin-Gehalt abschätzen, ohne eine Kalibrierung durchzuführen (natürlich ist keine Berechnung möglich)
- die Peaks der Mischung aus Theobromin, Theophyllin und Coffein haben nur ca. 1/3 der Höhe der Reinstoffe, da auch nur 1/3 der Menge zur Bestimmung verwendet wurde

#### Messung der Cola-Probe:

- dieses Chromatogramm zeigt Peaks von Coffein, einen niedrigen in der Nähe (geringe zeitliche Abweichung) von Theobromin sowie einige weitere, die vor der experimentellen Totzeit liegen
- diese Peaks stammen von Stoffen die zu groß sind, um in die Poren der stationären Phase zu passen
- damit sind keine Wechselwirkung möglich
- daraus resultiert eine geringere Retentionszeit als nach der experimentellen Bestimmung möglich sein sollte

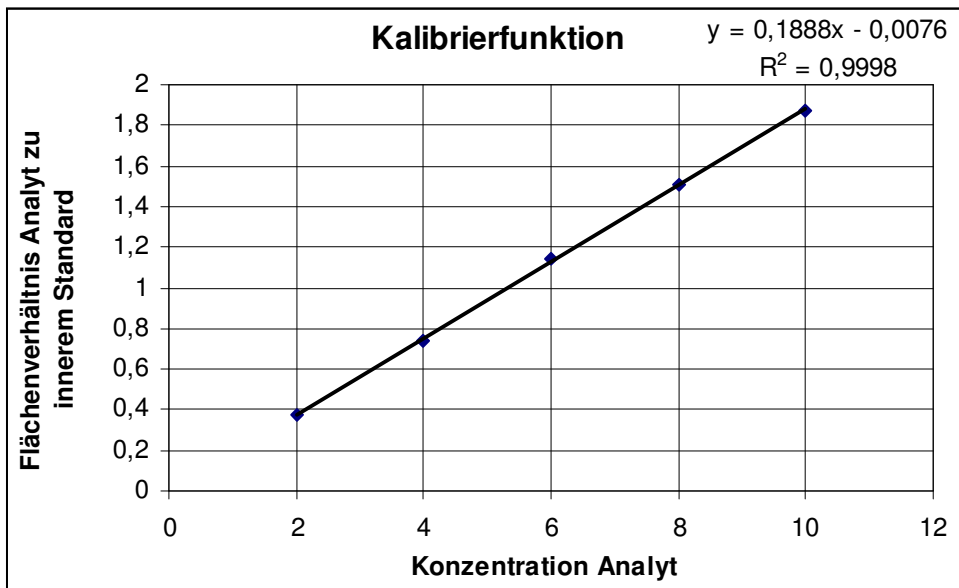
#### Messung der Kalibrierlösungen:

- die Auswertung der Chromatogramme erfolgt hinsichtlich der Peakflächen
- die Integration übernahm der Rechner
- anschließend wird das Signalverhältnis von Standardlösung zu innerem Standard gegen die Konzentration der Standardlösungen abgetragen
- mittels linearer Regression wird die Funktionsgleichung für die Kalibriergerade ermittelt

c (Analyt)	Flächenverhältnis (Analyt/Standard)
2 mg/L	0,370
4 mg/L	0,739
6 mg/L	1,138
8 mg/L	1,504
10 mg/L	1,875

- für die Kalibrierfunktion ergibt sich folgende Gleichung:

$$y = 0,1888 x - 0,0076$$



### Berechnung der Coffein-Konzentration der Probe-Lösungen:

#### Onko-Kaffee:

- Einwaage: 1 g Kaffeepulver
- Zugabe von 25 mL innerer Standard, aufkochen → Coffeingehalt der Einwaage geht in Lösung
- 10 µL davon abnehmen, mit 990 µL Wasser verdünnen und chromatographieren
  
- Fläche Analyt: 366,8
- Fläche innerer Standard: 349,0
- Flächenverhältnis: 1,05
  
- Einsetzen in Geradengleichung:
- $x = c = 5,60 \text{ mg/L} = 5,60 \text{ µg/mL}$  (Gehalt in 10 µL)
  
- dieser Gehalt befindet sich in dem 1 mL im Vial, was dem Gehalt entspricht, der vor der Verdünnung in 10 µL der Probelösung befand
- da nur der 2500ste Teil der Probelösung chromatographiert wurde, muss der oben genannte Wert mit 2500 multipliziert werden, um auf den Gehalt in 1 g Kaffeepulver zu kommen
- $x = 5,60 \text{ µg/g}$
  
- auf Grund der Verdünnung folgt für die Einwaage ein Coffeingehalt von:
- $x = 5,60 \text{ µg/g} * 2500$

→  $x = 14,00 \text{ mg/g}$

- in der Probe Onko-Kaffee befinden sich 14,00 mg Coffein in 1 g Trockenpulver

**Jakobs koffeinfreier Kaffee:**

- Einwaage: 2 g Kaffeepulver
- Probevorbereitung analog zu oben

- Fläche Analyt: 23,7
- Fläche innerer Standard: 324,4
- Flächenverhältnis: 0,07

- Einsetzen in Geradengleichung:
- $x = c = 0,43 \text{ mg/L} = 0,43 \text{ } \mu\text{g/mL}$  (Gehalt in 10  $\mu\text{L}$ )

- dieser Gehalt befindet sich in den abgenommenen 10  $\mu\text{L}$  Probelösung
- wiederum wurde nur 2500ste Teil der Probelösung chromatographiert, was 2 g Trockenpulver entspricht
- zur Gehaltsbestimmung in 1 g Trockenpulver muss der Gehalt somit erst durch 2 geteilt und anschließend mit 2500 multipliziert werden
- $x = 0,43 \text{ } \mu\text{g}/2\text{g} = 0,215 \text{ } \mu\text{g/g}$

- für den Coffeingehalt ergibt sich damit:
- $x = 0,215 \text{ } \mu\text{g/g} * 2500$
- $x = 537,5 \text{ } \mu\text{g/g}$

- die Probe des Jakobs koffeinfreien Kaffees enthält noch 537,5  $\mu\text{g}$  Coffein je g Trockenpulver

**Kakao-Pulver:**

- Einwaage:
- Probevorbereitung wie oben

- Fläche Analyt: 29,0
- Fläche innerer Standard: 318,8
- Flächenverhältnis: 0,09

- Einsetzen in Geradengleichung:
- $x = c = 0,52 \text{ mg/L} = 0,52 \text{ } \mu\text{g/mL}$  (Gehalt in 10  $\mu\text{L}$ )

- dies entspricht dem Gehalt in den abgenommenen 10  $\mu\text{L}$  Probelösung
- auch hier wurde nur 2500ste Teil der Probelösung chromatographiert, was 1 g Trockenpulver entspricht
- zur Gehaltsbestimmung in 1 g Trockenpulver muss der Gehalt somit mit 2500 multipliziert werden
- $x = 0,52 \text{ } \mu\text{g/g}$

- für den Coffeingehalt ergibt sich damit:
- $x = 0,52 \text{ } \mu\text{g/g} * 2500$
- $x = 1,30 \text{ mg/g}$

- die Probe des Kakaopulvers enthält 1,30 mg Coffein je g Trockenpulver

- zur Bestimmung des Theobromingehalts wird das ähnliche Ansprechverhalten dieses Stoffes im Vergleich zum inneren Standard im Chromatogramm ausgenutzt
- Peaks haben bei gleicher Konzentration annähernd gleiche Flächen

1 mL innerer Standard = 500 µg Theophyllin

10 µL = 5 µg Theophyllin → dies zeigt eine Peakfläche von 318,8

die Fläche des Theobromin-Peaks beträgt 428,8

→  $m(\text{Theobromin}) = [\text{Peakfläche}(\text{Theobromin}) \cdot m(\text{Theophyllin})] / \text{Peakfläche}(\text{Theophyllin})$   
 $m = 6,725 \mu\text{g}$  (Gehalt in 10 µL Probelösung)

- auch hier wurde nur 2500ste Teil der Probelösung chromatographiert, was 1 g Trockenpulver entspricht
- zur Gehaltsbestimmung in 1 g Trockenpulver muss der Gehalt somit mit 2500 multipliziert werden

→  $m = 6,725 \mu\text{g/g} \cdot 2500$

→  $m = 16,81 \text{ mg/g}$

- das Kakaopulver enthält ca. 16,8 mg Theobromin je g Trockenpulver (**Schätzung !**)

### Ermittlung der Porosität der Säule:

$$\begin{aligned} \varepsilon &= \frac{4 \cdot v \cdot t_0}{\pi \cdot d^2 \cdot l} \\ &= \frac{4 \cdot 0,2\text{mL} \cdot 1,631\text{min}}{\text{min} \cdot \pi \cdot 4\text{mm}^2 \cdot 125\text{mm}} \\ &= \underline{\underline{0,21}} \end{aligned}$$

- bei Vergrößerung der Porosität kommt es zu einem erhöhten Volumendurchsatz des Elutionsmittels und damit zu einer Verringerung der Elutionszeit durch Verringerung des Strömungswiderstands
- bei der verwendeten Säule ist das Verhältnis von Hohlraumvolumen zu Gesamtvolumen der Säule 0,21 (21%), damit hat die Säulenpackung eine große Oberfläche, was zu einer erhöhten Trennleistung führt

### Berechnung des Kapazitätsfaktors und der Trennstufenzahl von Coffein:

$$\begin{aligned} k &= \frac{t_R^1 - t_0}{t_0} & N &= 5,54 \cdot \left( \frac{t_R^1}{w_{1/2}^1} \right)^2 \\ &= \frac{4,329\text{min} - 1,631\text{min}}{1,631\text{min}} & &= 5,54 \cdot \left( \frac{4,329\text{min}}{0,19\text{min}} \right)^2 \\ &= \underline{\underline{1,65}} & &= \underline{\underline{2876}} \end{aligned}$$

- die optimalen Werte für k liegen im Bereich von 1-5

- bei Werten oberhalb des optimalen Bereichs verbessert sich die Auflösung nur noch geringfügig, die Zeit für die Trennung erhöht sich aber erheblich
- die Elutionszeit hat ihr Minimum bei einem k-Wert von etwa 2

### **Berechnung der Auflösung der Peaks von Coffein und innerem Standard:**

$$\begin{aligned}
 R &= 1,18 \cdot \frac{t_R^1 - t_R^2}{w_{1/2}^1 + w_{1/2}^2} \\
 &= 1,18 \cdot \frac{4,329\text{min} - 3,238\text{min}}{0,19\text{min} + 0,16\text{min}} \\
 &= \underline{\underline{3,68}}
 \end{aligned}$$

- die Auflösung ist ein Maß für die Trennung der Probenbestandteile
- je höher der Wert ist, umso besser sind die einzelnen Peaks voneinander getrennt
- so beträgt die Überlappung der Peaks bei einer Auflösung von 0,5 16% der Fläche, bei einer Auflösung von 1,5 nur noch ca. 0,1%

### **Fehlerbetrachtung:**

- auf Grund der Verwendung eines inneren Standards zur Kalibrierung / Messung können Fehler bei der Probenvorbereitung vernachlässigt werden
- Fehler können auftreten beim Abmessen der Flüssigkeitsmengen
- anhand der dreifachen Totzeitbestimmung erkennt man, dass es sich bei der verwendeten Methode um ein reproduzierbares Verfahren handelt, da sich die 3 Totzeiten nur unwesentlich unterscheiden
- systematische Gerätefehler können durch technischen Aufwand verringert werden

### **Ergebnis:**

- Totzeit: 1,631 min
- Coffeingehalt in **Onko-Kaffee**: 14,00 mg/g Pulver
- Coffeingehalt in **Jakobs koffeinfreier Kaffee**: 537,5 µg/g Pulver
- Coffeingehalt in **Kakaopulver**: 1,30 mg/g Pulver
- Theobromingehalt in **Kakaopulver**: 16,81 mg/g Pulver → Schätzung!

-----

Anhang:

Chromatogramme