

HPLC-Methodenentwicklung und anschließende Quantifizierung von Methylxanthinen in koffeinhaltigen Getränken

Modulverantwortlicher: Prof. Spittler
Betreuer: Patrick Swieca
Arne Helmers
Lennart Schmiedeken
Raum: A0140

1. Theorie

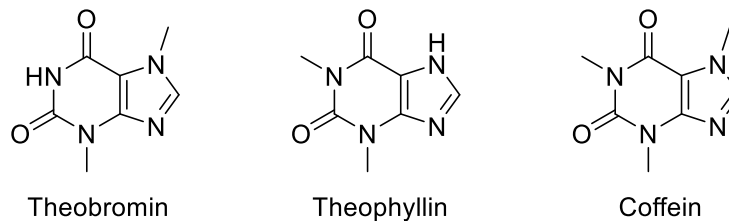


Abbildung 1: Strukturen der Methylxanthine.

Theobromin und Koffein gehören neben Theophyllin zur Gruppe der Methylxanthine, einer Substanzklasse der sog. Alkaloide. Strukturell weisen Theobromin, Koffein und Theophyllin alle das gleiche Xanthin-Grundgerüst auf. Sie unterscheiden sich nur in der Anzahl und Positionen der Methylgruppen (Abbildung 1).

Bei den Methylxanthinen handelt es sich um farb- und geruchlose Substanzen. Sie sind in Wasser löslich und werden durch Hitzeeinwirkung nicht verändert. Aufgrund der im Grundgerüst vorkommenden freien Elektronenpaare sind die Substanzen UV-aktiv, d.h., dass sie in der Lage sind, Strahlung im UV-Bereich zu absorbieren. Die strukturelle Ähnlichkeit der Methylxanthine führt zu Schwierigkeiten bei einer Trennung durch herkömmliche präparative Säulen.

1.1 Vorüberlegungen und Lernziele des Versuches

An einer automatischen HPLC-Anlage sollen Sie sich generell mit einer HPLC-Apparatur vertraut machen und den sachgemäßen Umgang damit lernen. Sie sollen eine aus den drei Methylxanthinen bestehende Analyselösung trennen, indem Sie eine chromatographische Methode entwickeln und untersuchen/verstehen wie sich die Parameter Laufmittelzusammensetzung (verschiedene isokratische Laufmittelkombinationen), Injektionsvolumen, Probenkonzentration, Flussrate und Detektorwellenlänge auf die Trennung, bzw. auf die Intensität der detektierten Signale auswirken. Weiterhin sollen sie die Kenndaten der verwendeten Chromatographiesäule bestimmen. Anschließend sollen Sie anhand von Kalibriergeraden die Koffeinkonzentration in einer unbekanntem Mischung in Form **eines von ihnen mitgebrachten koffeinhaltigen Getränks** bestimmen. (Anmerkung: Wir setzen in diesem Versuch keine alkohol- oder milchhaltigen Getränke ein.) **Diskutieren Sie die Funktionsweise eines Injektionsstandards, was sind die Anforderungen an einen geeigneten Injektionsstandard, und in welcher Konzentration sollte dieser Standard idealerweise eingesetzt werden**

1.2 Vorarbeiten/Vorüberlegungen

Sie erhalten Stammlösungen bekannter Konzentrationen der drei Methylxanthine gelöst in Wasser. Gearbeitet wird mit einer C8ec Säule (für weitere Details – siehe Säulenbeschriftung). **Wo ist diese zu finden?** Als Laufmittel verwenden sie unterschiedliche wässrig-methanolische Lösungen. Sie arbeiten mit einer quarternären Pumpe, d.h. sie können über die Kanäle A-D in der Steuerungssoftware alle 4 Lösungsmittel einzeln ansprechen, ohne dass die Flaschen gewechselt werden müssen. Die Flaschen enthalten A: 30% MeOH; B: 50% MeOH; C: 60% MeOH; D: 70% MeOH (Anmerkung: Verhältnisse hängen von verwendeter Säule ab). **Wie sind die Eigenschaften der Laufmittel und was fällt ihnen an der Reihe auf?** Diese Laufmittel stehen für sie bereit. Die HPLC Anlage verfügt über einen Autosampler, sodass Sie sämtliche zu untersuchende Proben in Glasgefäßen (Vials) vorbereiten und diese verständlich beschriften müssen. **Schlagen Sie die UV Spektren der 3 Methylxanthine nach und überlegen sie sich geeignete Detektorwellenlängen. Informieren sie sich über die typischerweise in Kaffee oder Tee vorkommenden Konzentrationen von Koffein, damit sie ihre Methode auf die notwendigen Bestimmungsgrenzen dieser Substanzen anpassen können.**

1.3 Inbetriebnahme der Anlage

Vor Inbetriebnahme machen Sie sich bitte mit den einzelnen Bausteinen der Anlage und ihrer Funktionsweise vertraut. Achten Sie darauf, dass der Lösungsmittelfilter stets vollständig mit Laufmittel bedeckt ist (**Warum?**). Prüfen Sie auch den Füllstand des Abfallbehälters in dem die mobile Phase nach Durchlaufen des Detektors aufgefangen wird. Neben dem Laufmittelvorrat sollte die Druckanzeige stets im Auge behalten werden. Bei Verwendung von hochprozentigen methanolischen Laufmitteln und einer Flussrate von 1 mL/min kann der Druck schnell das zulässige Maximum erreichen (**Warum?**). Das tolerierbare Druckmaximum beträgt für die verwendete Pumpe 350 bar (die Pumpe stellt sich bei höherem Druck automatisch ab). Bei starken Druckschwankungen befindet sich wahrscheinlich Luft in der Anlage. In diesem Fall bitte dem Betreuer Bescheid geben und zuschauen, wie sich dieses Problem beseitigen lässt. Stellen Sie mehrere geeignete (**Was heißt geeignet?**) Detektorwellenlängen ein.

2. Ermittlung von Säulenkenndaten

Für die **Bestimmung von Totzeit und Totvolumen** wird eine 0.001%ige Lösung von Thioharnstoff in Methanol bereitgestellt und in Fließmittel D chromatographiert. Dabei sind folgende Fragen experimentell zu bestimmen und im Protokoll zu beantworten:

- **Wie groß ist die Totzeit der verwendeten Säule?**
- **Wie groß ist das Totvolumen?**
- **Sind Totzeit und/oder Totvolumen abhängig von der injizierten Menge der 0.001%igen Thioharnstofflösung (Injektion von 3 μ L, 5 μ L und 7 μ L)?**
- **Sind Totzeit, Totvolumen und Druck abhängig von der Flussrate? Verwenden sie Flussraten von 0.3, 0.5 und 0.7 ml/min.**
- **Welchen Anforderungen chromatographischer und gerätetechnischer Natur muss eine Verbindung genügen, mit der man Totzeit/Totvolumen bestimmen kann?**

Um die spätere Auswertung zu ermöglichen, sind folgende Daten zur Auswertung notwendig: Säule (Material), Dimension, Fließmittel, Flussrate, Probenart, Probenmenge, Druck und Retentionszeiten der Peaks.

Sie erhalten eine Testmischung die alle 3 oben gezeigten Methylxanthine in der Endkonzentration von 0.2 mM enthält. Chromatographieren Sie 5 μ l dieser Mischung unter isokratischen Bedingungen mit den Fließmitteln A, B, C und D bei einer Flussrate von 1 ml/min.

- **Bei welchen Bedingungen erhalten Sie eine basisliniengetrennte Auflösung der 3 Substanzen?**
- **Bei welchem Peak handelt es sich um welche Substanz und warum? (Dies kann zum Teil nur im Zusammenhang mit den anderen Tabellen beantwortet werden)**

Ermitteln Sie jeweils:

- **die Kapazitätsfaktoren k' der Methylxanthine**
- **die theoretische Bodenzahl N der jeweiligen Verbindung**
- **die Höhe eines theoretischen Bodens HETP der jeweiligen Verbindung**
- **die Auflösung R jeweils zweier Peaks für jede mögliche Kombination**

Tragen Sie dazu graphisch den dekadischen Logarithmus des Kapazitätsfaktors $\lg k'$ gegen den Volumenanteil (in %) des Methanols in der mobilen Phase \emptyset auf. Ergibt sich ein linearer Zusammenhang? Wenn ja, bestimmen Sie die Koeffizienten a und b nach

$$\lg k' = a \emptyset + b$$

Was sagen diese Werte aus? Mit welchen Eigenschaften der jeweiligen Verbindung sind a und b verbunden? Welche Konsequenzen ergeben sich, wenn sich die Graphen zweier Verbindungen schneiden?

3. Verdünnungs- und Kalibrierreihen

Nachdem Sie sich über das Vorkommen und die natürlich vorkommenden Konzentrationen von Koffein und anderen Methylxanthinen in koffeinhaltigen Getränken informiert haben, stellen sie aus der angegebenen Stammlösung von Koffein 5 Verdünnungen als Mischstandards her. Jede Verdünnung sollte zusätzlich mit einem internen Standard (Theophyllin) versetzt werden, sodass dieser in einer Gesamtkonzentration von 0.5 mM vorliegt. Folgende Stammlösungen stehen zur Verfügung:

Coffein: 25 mg/100 ml

Theophyllin: 90 mg/100 ml

Füllen sie folgende Tabelle vor Versuchsbeginn aus und halten Sie dies beim Antestat bereit:

C_{soll}	V_{Coffein}	$V_{\text{Theophyllin}}$	V_{Wasser}	V_{ges}
2.5 mg/ 100 ml				1 ml
5 mg/ 100 ml				1 ml
7.5 mg/ 100 ml				1 ml
10 mg/ 100 ml				1 ml
12.5 mg/ 100 ml				1 ml

Diese Verdünnungsreihen dienen weiter unten zur Erstellung von Kalibrierreihen. Lassen Sie diese 5 Proben für die Erstellung von Kalibrierreihen mit dem am besten geeigneten Laufmittel und der optimalen Fließgeschwindigkeit (**welches Laufmittel/Fließgeschwindigkeit ist laut ihren Experimenten oben am besten zur Trennung der Methylxanthine geeignet?**) jeweils dreimal laufen (**warum 3 mal?**). Alle anderen Parameter wie Injektionsvolumen, Detektorwellenlänge(n), Temperatur müssen bei diesen Messungen gleich gehalten werden (**warum?**). Während diese Proben automatisch gemessen werden kümmern sie sich parallel schon um die Arbeitsschritte unter 4.0.

Erstellen Sie aus diesen Messungen graphisch Kalibriergeraden. Ermitteln sie die Messgenauigkeit dieses Verfahrens, indem Sie die Standardabweichung als Maß für die Streuung der Messwerte um die Kalibriergerade bestimmen.

(Anmerkung: Für eine korrekte Kalibration sollten mindestens zwei unterschiedliche Stammlösungen erstellt werden (**warum?**), was jedoch aus Zeitgründen hier nicht umgesetzt wird.)

4. Quantifizierung von Koffein in einem Getränk mittels internem Standard (Theophyllin)

Die von Ihnen mitgebrachte Probe (alkohol- und milchfreies Getränk) wird in drei Aliquote geteilt (3 Replikate). Jede Probe wird mit dem internen Standard versetzt sodass die Endkonzentration 0.5 mM Theophyllin beträgt. **Überlegen Sie sich in welcher ungefähren Konzentration der interne Standard eingesetzt werden sollte und wozu dieser Standard dient.**

Weiterhin zentrifugieren sie ungelöste Bestandteile in den Replikaten ab und stellen bei kohlen säurehaltigen Getränken die Probe ins Ultraschalbad (**warum?**). Vor der Chromatographie der replizierten Proben muss sichergestellt werden, dass diese keine Substanzen enthalten, die irreversibel auf der HPLC Säule binden könnten. Dies geschieht mittels Festphasenextraktion (solid-phase extraction, SPE) mit Hilfe einer Kartusche, die dasselbe oder sehr ähnliches Trennmateriale wie die HPLC Säule enthält. Das SPE Prozedere läuft wie folgt: Eine C18 Material enthaltene Kartusche wird am Stativ eingespannt und mit folgenden Lösungsmitteln erst konditioniert, dann chromatographiert, und anschließend wieder gereinigt. Dabei muss sichergestellt werden, dass die Kartusche nicht trocken läuft.

Trennphase	Bond Elut, C18, 100mg
Konditionierung	3 x 900 µl Methanol 3 x 900 µl dest. Wasser
Probe	1 x 900 µl Getränk, plus Interner Standard
Wäsche	2 x 900 µl dest. Wasser
Elution	1 x 900 µl 80% Methanol (Eluat)
Rekonditionierung	3 x 900 µl Methanol 3 x 900 µl Acetonitril

Jedes Replikat ihrer Getränkeproben wird per SPE vorbereitet. Aus den Eluaten werden nun die Proben zur Quantifizierung hergestellt. Injizieren sie jedes Replikat auf der HPLC jeweils dreimal (technische Replikate).

Die Getränkeproben sollen mit den optimalen Messparametern wie unter 3.0 ermittelt, analysiert und vermessen werden, sodass sie die oben ermittelten Kalibrierfunktionen zur Quantifizierung des Koffeins einsetzen können. Da die Getränkeproben zusätzliche, potenziell stark mit dem Säulenmaterial interagierende, Substanzen als Theophyllin und Koffein enthalten sollte nach jedem HPLC Schritt ein kurzer Spülschritt mit 100 % Methanol erfolgen, um die HPLC Säule nicht zu kontaminieren. Beachten sie: Eine der Lösungsmittelleitungen muss für diesen Versuch getauscht werden, bitte machen Sie Ihren Betreuer darauf aufmerksam wenn Sie an diesem Punkt angekommen sind.

Bestimmen sie den Koffein Gehalt der Getränke aus der Dreifachbestimmung sowie die Standardabweichung und Varianz ihrer Messergebnisse. Berechnen, vergleichen und diskutieren sie die statistische Standardabweichung der Koffeinkonzentrationen in den technischen und echten Replikaten. Vergleichen sie ihre Werte mit denen aus der Literatur und diskutieren sie anschließend ihre Messergebnisse.

5. Protokoll

Das Protokoll bezieht sich ausschließlich aus den bei dem Versuch erhaltenen Messwerten, die in übersichtlichen Tabellen beizufügen sind. Sie erhalten vom Betreuer Ihre Messdaten elektronisch. Ein theoretischer Grundlagenteil ist nicht erforderlich und wurde hoffentlich im Antestat besprochen. Halten Sie sich bei der Gestaltung des Protokolls an die untenstehende Vorlage. Schreiben Sie Das Protokoll muss innerhalb einer Woche abgegeben werden und wird in Gruppen von bis zu vier Leuten bearbeitet. Ein Umfang von 10 Seiten sollte nach Möglichkeit nicht überschritten werden.

Im Praktikums-Skript kursiv markierte Fragen und Aufgaben sind im Protokoll zu berücksichtigen und zu diskutieren. Insbesondere adressieren sie bitte im Protokoll folgende Fragen und Aufgabenstellungen:

- Skizzieren Sie den groben Aufbau der im Video gezeigten HPLC-Anlage und beschriften Sie alle wichtigen Bestandteile
- Welches sind geeignete UV Detektorwellenlängen für die 3 Methylxanthine?
- In welchen natürlichen Konzentrationen finden sie Koffein in koffeinhaltigen Getränken?
- Ermittlung von Säulenkenndaten, Totzeit und Totvolumen, Kapazitätsfaktoren der Substanzen, theoretische Bodenzahl, HETP, Auflösung benachbarter Substanzsignale, Diskussion der Koeffizienten a und b (s. Fragen unter Punkt 2).
- Diskussion von systematischen Fehlern bei Herstellung von Verdünnungsreihen
- Diskussion der optimalen Trennungsbedingungen. Warum wird unter welchen Bedingungen gemessen?
- Auftragung von Kalibriergeraden, Ermittlung der Messgenauigkeit anhand von Standardabweichung als Maß für die Streuung der Messwerte um die Kalibriergerade.
- Diskutieren Sie die Funktionsweise eines internen Standards, was sind die Anforderungen an einen geeigneten internen Standard, und in welcher Konzentration sollte dieser Standard idealerweise eingesetzt werden.
- Wozu dient eine SPE?
- Bestimmen sie den Koffein Gehalt der Getränke aus der Dreifachbestimmung sowie die Standardabweichung und Varianz ihrer Messergebnisse. Berechnen, vergleichen und diskutieren sie die statistische Standardabweichung der Koffeinkonzentrationen in den technischen und echten Replikaten. Vergleichen sie ihre Werte mit denen aus der Literatur und diskutieren sie anschließend ihre Messergebnisse. Um welche Art der Probe könnte es sich handeln?

Protokoll-Vorlage

Titel

Einleitung:

Hier sollte kurz in das Thema eingeführt werden. Wozu dient eine HPLC-Anlage? Und fügen Sie die Skizze passend ein. Kein theoretischer Hintergrund über die Funktionsweise der einzelnen Bestandteile.

Aufgabenstellung:

Was soll gemacht werden und warum wollen Sie dies tun?

Ergebnisse:

Stellen Sie alle Ergebnisse übersichtlich in passender Reihenfolge dar. Welche Rückschlüsse sind aus den Ergebnissen zu ziehen? Messungen und Rechnungen müssen mit entsprechenden Formeln und Beispielrechnungen klar nachvollziehbar sein. Größere Datensätze sollen übersichtlich in tabellarischer Form präsentiert werden. Graphen sollen vollständig beschriftet und theoretisch auch ohne Text verständlich sein.

Diskussion:

Hier soll eine Fehlerdiskussion eingefügt werden. Diskutieren Sie mögliche fehlerhafte Werte und begründen Sie diese. Wie können entsprechende Fehler aufgetreten sein und wie werden sie künftig vermieden. Was haben diese Fehler mit den Ergebnissen zu tun und führen Sie zu großen Abweichungen?

Zusammenfassung:

Fassen sie ihre Ergebnisse kurz und knapp zusammen. Wurde die Aufgabenstellung erfolgreich bearbeitet?