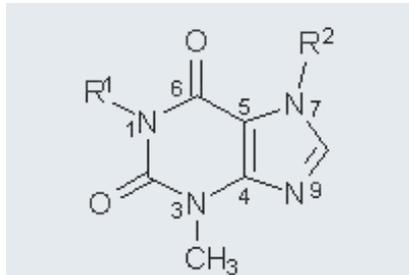


HPLC-Methodenentwicklung und anschließende Quantifizierung von Methylxanthenen in koffeinhaltigen Getränken

1 Theorie



R¹ = H, R² = CH₃: Theobromin
R¹ = CH₃, R² = H: Theophyllin
R¹ = R² = CH₃: Coffein

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 (s. Abbildung).

Bei den Methylxanthenen 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.

1.1 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 Methylxanthenen 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 milchhaltigen Getränke ein.) Machen Sie sich mit der Funktion und den Kriterien eines geeigneten internen Standards vertraut.

1.2 Vorarbeiten/Vorüberlegungen

Sie erhalten Stammlösungen bekannter Konzentrationen der drei Methylxanthine gelöst in Wasser. Gearbeitet wird mit einer RP-18ec Säule (für weitere Details – siehe Säulenbeschriftung). Als Laufmittel verwenden sie unterschiedliche wässrig-methanolische Lösungen. Sie arbeiten mit einer quaternären 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: 10% MeOH; B: 20% MeOH; C: 30% MeOH; D: 60% MeOH. 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 Nachweisgrenzen 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 sind (**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. Das tolerierbare Druckmaximum beträgt für die verwendeten 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.

2.0 Ermittlung von Säulenkenndaten

Für die **Bestimmung von Totzeit und Totvolumen** wird eine 0,1 % 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 Retentionszeit (Totzeit) der verwendeten Säule?**
- **Wie groß ist das Totvolumen?**
- **Sind Totzeit und/oder Totvolumen abhängig von der injizierten Menge 0,1% Thioharnstofflösung (Injektion von 5 µL, 10 µL und 25 µL)?**
- **Sind Totzeit und/oder Totvolumen abhängig von der Flussrate? Verwenden sie Flußraten von 0,5, 0,7 und 1,0 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 Stammlösungen bekannter Konzentrationen der drei Methylxanthine gelöst in Wasser:

Theobromin:	7.8 mg/100mL
Theophyllin:	112 mg/100mL
Coffein:	25 mg/100mL

Mischen Sie sich aus diesen Stammlösungen eine Testmischung die alle 3 Methylxanthine in der Endkonzentration von 0.2 mM enthält. Chromatographieren Sie 10 µl 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?

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?

3.0 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 den Stammlösungen von Koffein 6 Verdünnungen als Mischstandards her, die den zu erwartenden natürlich vorkommenden Konzentrationsbereich in den Getränkeproben in äquidistanten Schritten gut abdecken. Jede Verdünnung sollte zusätzlich mit einem internen Standard (Theophyllin) versetzt werden (Endkonzentration 0.5 mM). **Überlegen Sie sich, wie sie diese Verdünnungsreihen so durchführen, dass die Fehlerfortpflanzung dabei minimiert wird. Diskutieren Sie die Funktionsweise eines Injektionsstandards, was sind die Anforderungen an einen geeigneten Injektionsstandard, und in welcher Konzentration sollte dieser Standard idealerweise eingesetzt werden**

Diese Verdünnungsreihen dienen weiter unten zur Erstellung von Kalibrierreihen. Lassen Sie diese 6 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.

4.0 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 kohlenensäurehaltigen 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 : MeOH 98:2
Probe	1 x 900 µl Getränk, plus Interner Standard, plus MeOH sodass die finale Konzentration 2 % MeOH beträgt
Wäsche	2 x 900 µl dest. Wasser : MeOH (98:2)
Elution	1 x 900 µl 80% Methanol (Eluat)
Rekonditionierung	3 x 900 µl 100% Methanol 3 x 900 µl 100% Acetonitril

Jedes Replikate ihrer Getränkeproben wird per SPE vorbereitet. Aus den Eluaten werden nun die Proben zur Quantifizierung hergestellt. Zunächst justieren sie die Eluatproben im Messzylinder auf 2 ml. Aliquotieren sie nun 1 ml der Proben in beschriftete Autosamplergefäße. Injizieren sie jedes Replikate 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 als Anlage beizufügen sind. Sie erhalten vom Betreuer Ihre Messdaten elektronisch. Ein theoretischer Grundlagenteil ist nicht erforderlich. Das Protokoll muss vor Beginn des nächsten Versuches abgegeben werden. Ist dies Ihr letzter Versuch erwarten wir das Protokoll innerhalb einer Woche.

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 Aufgaben:

- *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.*
- *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.*
- *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.*