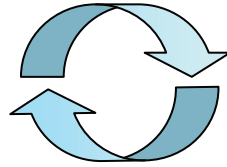


HPLC: Quantitative Bestimmung von Coffein nach der Methode des äußeren Standards

Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan Nr. 7.6](#)



Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfelder 4, 8](#)

Geräte: HPLC-System mit 20- μ L-Injektor, RP18-Säule, Autosampler oder HPLC-Spritze, Auswertesystem, Bürette, Pipetten, Messkolben, Waage

Chemikalien: Coffein (R-Sätze: 20 - 25, S-Sätze: 22 - 24 - 44, T = Giftig), Methanol (R-Sätze: 11 - 23 / 25, S-Sätze: 2 - 7 - 16 - 24, VbF: B, T = Giftig, F = leichtentzündlich, fruchtschädigend: D), Wasser (HPLC-Qualität)

1. Prinzip

Mit der quantitativen Methode des äußeren Standards werden Kalibrierlösungen mit genau definierter Konzentration im HPLC-System chromatografiert. Die Peakfläche des Coffeins in den Chromatogrammen wird dann in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die Gerade wird beurteilt. Anschließend wird eine Probenlösung injiziert. Aus der erhaltenen Peakfläche wird mit Hilfe der Geradengleichung die Konzentration an Coffein extrapoliert.

2. Orientierungsfragen

- (1) Was versteht man unter einer „linearen Regression“?
- (2) Was versteht man unter „Kalibrierlösungen“?
- (3) Welche Vor- und Nachteile hat die Methode des äußeren Standards?
- (4) Was würde eine Luftblase im HPLC-System bewirken?
- (5) Was versteht man unter "isokratischer Arbeitsweise" und unter „Gradientensystem“?

3. HPLC-Bedingungen

HPLC-Säule: RP 18 (z. B. Hypersil ODS), Korndurchmesser 5 μ m, Innendurchmesser 4 oder 4,6 mm

Injektor: Autosampler oder Sixportventil, Schleife 20 μ L

Eluent: 60/40 % (V/V), isokratische Injektion: 100 μ L in die 20- μ L-Schleife

Wellenlänge: 273 nm

4. Durchführung

4.1 Herstellung und Messung der Kalibrierlösungen

Herstellung der Coffein-Standard-Lösung

100 mg Coffein, auf 0,5 mg genau gewogen, werden mit Wasser in einen 100-mL-Kolben übergespült, der mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird.

Herstellung der Kalibrierlösungen

KL1: 5,00 mL der Stammlösung werden in einer 25-mL-Bürette abgemessen und in einen 100-mL-Kolben gefüllt, der mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird (5 mg/mL).

KL2: 7,50 mL der Stammlösung werden in einer 25-mL-Bürette abgemessen und in einen 100-mL-Kolben gefüllt, der mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird (7,5 mg/mL).

KL3: 10,00 mL der Stammlösung werden in einer 25-mL-Bürette abgemessen und in einen 100-mL-Kolben gefüllt, der mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird (10 mg/mL).

KL4: 12,5,00 mL der Stammlösung werden in einer 25-mL-Bürette abgemessen und in einen 100-mL-Kolben gefüllt, der mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird (12,5 mg/mL).

KL5: 15,00 mL der Stammlösung werden in einer 25-mL-Bürette abgemessen und in einen 100-mL-Kolben gefüllt, der mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird (15 mg/mL).

Alle Lösungen werden einer Mikrofiltration unterworfen.

Jeweils 100 μ L der Kalibrierlösung werden in den 20- μ L-Injektor injiziert und chromatografiert. Bei der Injektion darf keine Luft in das System gelangen. Es soll ein aussagekräftiges Chromatogramm entstehen. Die Injektion ist zu wiederholen (Doppelbestimmung). Falls sich die beiden Flächen nicht um mehr als 0,5 % (relativ) unterscheiden, ist aus den beiden Peakflächen der Mittelwert zu bilden. Ist der Unterschied zu groß, sollte die Messung wiederholt werden.

Es werden die jeweiligen Peakflächen in Abhängigkeit von der Konzentration (KL1 bis KL5) in einer Tabelle zusammengefasst.

4.2 Analyse der Probemesslösung

Anschließend wird die erhaltene Probenlösung an Coffein, die 8 bis 12 mg Coffein enthält, in einen 100-mL-Messkolben gespült, der mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird. Diese Probenmesslösung wird einer Mikrofiltration unterworfen und dann unter gleichen Bedingungen chromatografiert. Die Injektion ist zu wiederholen (Doppelbestimmung). Aus den beiden Peakflächen ist der Mittelwert zu bilden, falls sich die beiden Flächen nicht um mehr als 0,5 % (relativ) unterscheiden.

5. Auswertung

Aus den erhaltenen Daten der Kalibrierläufe wird in Abhängigkeit der Peakfläche von der Konzentration an Coffein eine lineare Regression (Trendbildung) durchgeführt. Dazu können Rechnerprogramme (Taschenrechner) oder eine Tabellenkalkulation wie z. B. EXCEL benutzt werden. Es sollen folgende Daten berechnet werden:

- Steigung (m)
- Achsenabschnitt (b)
- Korrelationskoeffizient (r oder R)

Der Korrelationskoeffizient sollte $r > 0,98$ sein, sonst ist der streng lineare Zusammenhang nicht gesichert. Der Achsenabschnitt sollte sich nicht wesentlich von „0“ unterscheiden. Ist das doch der Fall, sollte die Kalibrierung wiederholt werden.

Aus der durch die lineare Regression erhaltenen Geradengleichung

$$\text{Peakfläche} = m \cdot \text{Konzentration} + b$$

ist durch Umstellen der Gleichung nach „Konzentration“ und dem Einsetzen der Peakfläche der Probenmesslösung die Konzentration an Coffein zu ermitteln.

6. Fragen zur Durchführung

- (1) Warum darf nur eine Spritze mit abgerundeter Injektionsnadel benutzt werden?
- (2) In die 20- μL -Schleife werden 100 μL injiziert. Was passiert mit den „überflüssigen“ 80 μL injizierte Lösung?
- (3) Warum müssen die Kalibrierlösungen einer Mikrofiltration unterworfen werden?
- (4) Was versteht man unter „Äquidistanz“ und wurde diese eingehalten?
- (5) Was sagt der Achsenabschnitt b aus? Warum sollte sich der möglichst nicht von „0“ unterscheiden?
- (6) Wie würde eine „Gerade“ aussehen, die einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,8$ hätte?

7. Umsetzungsvorschlag für den Ausbildungsbetrieb

7.1 Herstellung der Probe

Es werden 100 mg Coffein auf 0,5 mg genau gewogen, mit Wasser in einen 100-ml-Messkolben gespült, der dann mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird. In eine Probenflasche werden 8,00 bis 12,00 mL, auf 0,01 mL genau abgemessen und mit 5 bis 10 mL Wasser verdünnt. Die Proben sind im Kühlschrank mindestens 4 Wochen haltbar.

7.2 Zeitbedarf

Der durchschnittliche Zeitbedarf zur Durchführung der Aufgabe beträgt ca. 6 Stunden.

7.3 Bewertungsvorschlag

In den folgenden Formeln

$$P = 100 \cdot e^{-\frac{(\Delta - V)^2}{2 \cdot s^2}}$$

$$\Delta = \frac{|\text{Sollwert} - \text{Istwert}|}{\text{Sollwert}} \cdot 100\%$$

bedeuten:

- P Punkte von Hundert
- Δ relative Differenz Soll- und Istwert in %
- s Sigma
- V Vorgabe, innerhalb dieser werden immer 100 Punkte erzielt

Es wird als Vorgabe $V = 0,7 \%$ und $s = 1,875$ vorgeschlagen. Zwischen $\Delta = 0 \%$ und der Vorgabe $V = 0,7 \%$ werden 100 Punkte erzielt.

In der folgenden Kurvenfunktion kann der Punktwert grafisch bestimmt werden.

