

## Protokoll Schülerversuch

### **„Chromatographische Auftrennung von verschiedenen Kaffee- und Tee-Proben zur Bestimmung des Coffein-Gehaltes und anschließende Auswertung der Ergebnisse mit spezieller Software“**

#### **1. Das Prinzip der HPLC**

Das Wort HPLC ist eine Abkürzung für *high performance liquid chromatography* und bedeutet Hochleistungsflüssigchromatographie.

Es handelt sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase (auch "Eluent" genannt) durch eine Trennsäule, die die stationäre Phase enthält, gepumpt wird.

Sind die Wechselwirkungen eines Bestandteils der zu untersuchenden Substanz mit der stationären Phase stark, verbleibt er relativ lange in der Säule. Sind die Wechselwirkungen schwach, verlässt er die Säule früher. Je nachdem erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Zeiten (Retentionszeiten) am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden können.

Die RP-HPLC ist in der Praxis die gängigste Methode. Hier wird eine unpolare stationäre Phase verwendet. Diese wird hergestellt, indem man Silane mit Silicagel reagieren lässt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen und die Polarität umgekehrt (engl.: "reversed"). Als Eluent werden meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril oder Methanol eingesetzt. Anders als bei isokratischen Trennungen wird die Polarität des Fließmittelgemisches bei Gradiententrennungen während der Analyse verändert. Dafür wird meist eine C18-Säule eingesetzt, die Detektion erfolgt zumeist mittels UV- oder Fluoreszenzdetektor.

Will man die Konzentration einer chemischen Substanz bestimmen (z. B. von Coffein), so erstellt man zuerst Standardlösungen bekannter Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz und vergleicht dann die Peak-Flächen der Standards mit den Peak-Flächen der Substanz in den Proben. (Wikipedia)

#### **2. Methode**

##### **2.1 Herstellung der Proben**

Aus den Tee- bzw. Kaffee-Proben wird nach einem vorgegebenen Protokoll das Coffein extrahiert, verdünnt und mittels HPLC gemessen.

##### **2.2 Herstellung der Coffein-Stammlösung**

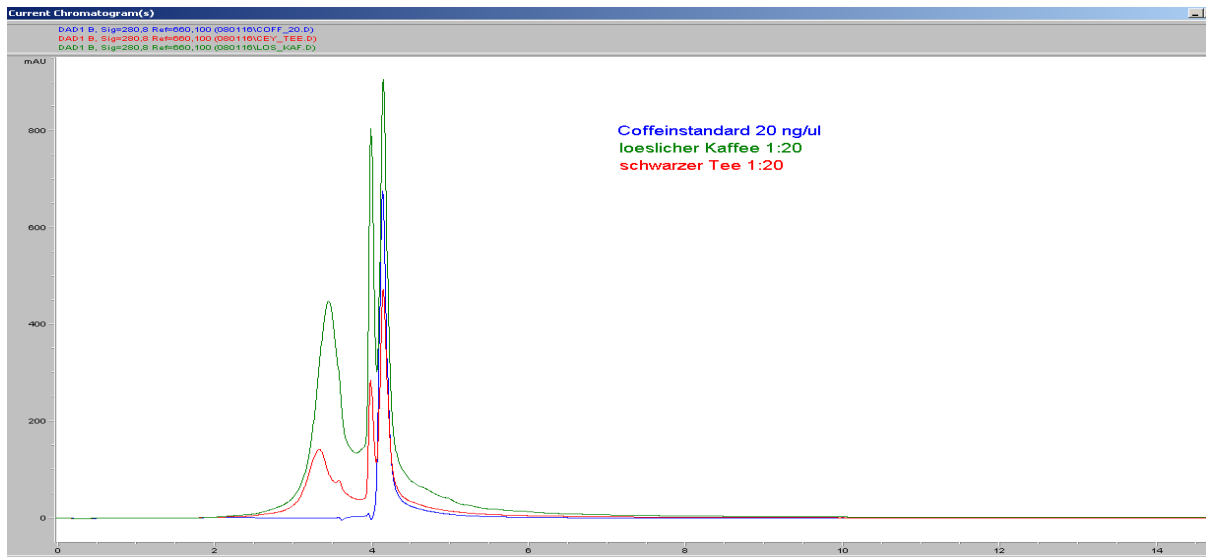
Die Coffein-Standardlösung (Konzentration = 1mg/ml) wird vorgegeben. Mit Hilfe dieser Stammlösung wird eine Kalibriergerade erstellt.

### 2.3 HPLC-Messung der Proben

In der HPLC-Software wird eine Sequenz zur Messung der Proben erstellt und die Proben mit einem Lösungsmittelgradienten gemessen.

Als Lösungsmittel wird 50% Acetonitril in Wasser verwendet. Der Gradient hat eine Laufzeit von 15 min bei einer Säulentemperatur von 35°C.

### 3. Ergebnisse und Auswertung



Beispielchromatogramm einer Coffeinbestimmung

Anhand der Kalibriergerade von Coffein kann die Konzentration an Coffein in den Kaffee- und Tee-Proben bestimmt werden. Für die Kalibriergerade wurden 5 verschiedene Konzentrationen von Coffein gemessen und die erhaltenen Peakflächen gegen die Konzentration aufgetragen. In die Geradengleichung können nun die Flächen unter den Coffein-Peaks der Proben eingesetzt werden und die Konzentrationen berechnet werden.

Tabelle mit Beispielergebnissen

Probe	Area bei 280 nm [mAU*s]	Retention Time [min]	Coffeinkonzentration in der Probe mit Kalibriergeradengleichung [ng/µl]	Coffeinkonzentration der Probe vor der 1:20-Verdünnung [ng/µl]	Coffeinkonzentration in einer Tasse [mg/150ml]
löslicher Kaffee	9488,9	4,134	33,12	662,32	99,34
Schwarzer Tee	4634,2	4,135	16,17	323,45	48,52