

Določanje kofeina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

Opis metode:

RP HPLC je separacijska metoda, s katero smo ločili alkaloidne v vzorcu. RP pomeni reversed phase: mobilna faza je polarna (mešanica organskih topil in H₂O, v našem primeru raztopina acetonitrila), stacionarna pa nepolarna. Alkaloide smo detektirali z UV-detektorjem pri 280 nm.

Potek dela:

Umeritvena krivulja:

Pripravimo 5 standardnih raztopin kofeina (20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) v 50 mL bučke iz osnovne raztopine s konc. 1 mg/mL. Vbrizgamo na kolono (20 µL) in odčitamo površino vrhov.

Vzorec:

Pripravimo jih z ustrežno razredčitvijo (Coca-Cola 5-krat in Red Bull 10-krat) in vbrizgamo v kolono.

Meritve in račun:

Umeritvena krivulja:

Po enačbi $y = 599659x$ (kjer je y višina vrha in x koncentracija) prepračunamo koncentracije v vzorcu tako, da višino vrhov delimo z dobljenim faktorjem 599659. Dobljeno koncentracijo pa je potrebno pri Coca-Coli (oznaka CC) še množiti z 5 in pri Red Bull-u še množiti z 10 zaradi dodatnih redčitev pri nanosu vzorca na kolono.

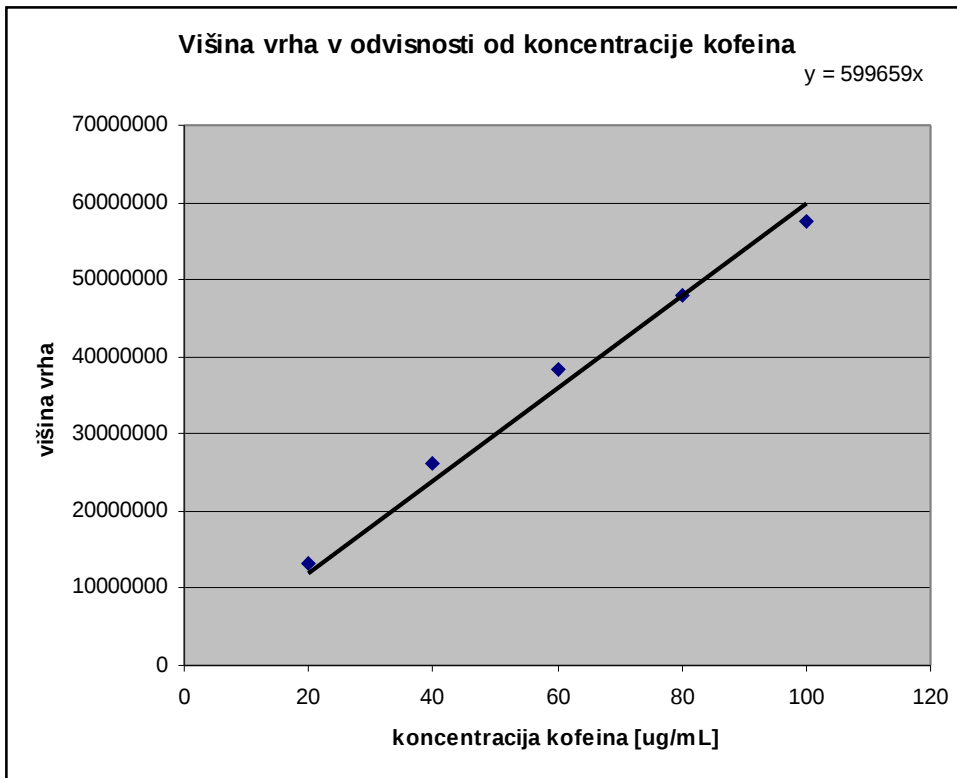
Primeri izračuna:

$$C_{CC} = (15684304 / 599659) * 5 = 130,7 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$C_{RB} = (21981728 / 599659) * 10 = 366,57 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Ker smo opravili po tri meritve za vsak vzorec, potem le-te povprečimo.

	<i>povpr. koncentracija</i>	<i>koncentracija</i>	<i>retencijski čas</i>	<i>višina vrha</i>	<i>polovična širina vrha</i>	<i>N = št. teoretskih podov</i>
	<i>[µg/mL]</i>	<i>[µg/mL]</i>	<i>[min]</i>	<i>[/]</i>	<i>[/]</i>	<i>[/]</i>
		20	4,594	13115784	0,221	2394
		40	4,752	26167328	0,222	2538
		60	4,746	38286592	0,224	2487
		80	4,75	47872864	0,225	2469
		100	4,628	57564640	0,227	2303
CC	121	130,777	4,676	15684304	0,215	2620
		116,978	4,68	14029440	0,219	2530
		113,955	4,658	13666888	0,215	2600
RB	364	366,570	4,627	21981728	0,214	2590
		357,101	4,623	21413904	0,211	2659
		367,025	4,615	22009008	0,216	2529
						2520



Za učinkovitost kolone izračunamo število teoretskih podov po enačbi:

$$N = 5,54 * (t_r / w_{1/2})^2,$$

kjer je t_r retencijski čas in $w_{1/2}$ polovična širina kromatografskega vrha kofeina, in dobimo, da ima naša kolona vrednost $N = 2520$.

Rezultat:

**Koncentracija kofeina v Coca-Coli je 121 $\mu\text{g/mL}$, v Red Bull-u pa 364 $\mu\text{g/mL}$.
Število teoretskih podov naše kolone je 2520.**