Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 55 (1964)

Heft: 5

Artikel: UV-Spektrophotometrische Coffein-Bestimmung in Kaffee : neue Methode zur Bestimmung des Coffein-Gehaltes in Roh- und Röstkaffee, Kaffee-Extrakten und entcoffeinierten Produkten

Autor: Hadorn, H. / Zürcher, K.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982399

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 16.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

UV-Spektrophotometrische Coffein-Bestimmung in Kaffee

Neue Methode zur Bestimmung des Coffein-Gehaltes in Roh- und Röstkaffee, Kaffee-Extrakten und entcoffeinierten Produkten

Von *H. Hadorn* und *K. Zürcher*

Laboratorium des Verbandes Schweiz. Konsumvereine (VSK), Basel

Über die Coffein-Bestimmung in Kaffee sind bereits eine große Zahl von Arbeiten veröffentlicht worden. Dies deutet darauf hin, daß die Coffein-Bestimmung mit einigen Schwierigkeiten verbunden ist und den meisten der beschriebenen Methoden gewisse Mängel anhaften.

Die sogenannten klassischen Methoden von *Lendrich* und *Nottbohm* (1), *Großfeld* und *Steinhoff* (2), *Fendler* und *Stüber* (3), *Pritzker* und *Jungkunz* (4), *Hilger, Juckenack* und *Wimmer* (5) sind meistens recht umständlich und eignen sich hauptsächlich für nicht entcoffeinierten Kaffee. Die einfachere Perforationsmethode von *Hadorn* und *Jungkunz* (6) versagt bei den neuerdings im Handel befindlichen Kaffee-Extrakten, weil sich während der Perforation mit Chloroform lästige Emulsionen bilden. Zur Coffein-Bestimmung in entcoffeiniertem Kaffee und Kaffee-Extrakt sind viele Methoden ungeeignet, weil in diesem Fall extrem kleine Mengen Coffein quantitativ aus dem Röstkaffee herausgeholt werden müssen. Bei der Extraktion und Aufarbeitung des Coffeins entstehen einerseits beträchtliche Verluste, anderseits ist das isolierte Coffein meistens stark verunreinigt. Diese Fehler können sich gegenseitig kompensieren, die Resultate sind jedoch in vielen Fällen recht unzuverlässig. In den letzten Jahren sind verschiedene neue Methoden für die Bestimmung des Coffeins in entcoffeiniertem Kaffee bekannt geworden (7—14). Zur Isolierung des Coffeins aus dem Kaffee und zur Reinigung der erhaltenen Auszüge werden zahlreiche Operationen empfohlen, denen jedoch gewisse systematische Fehler anhaften können. Auf einige der häufigsten, aber schwer kontrollierbaren Fehlerquellen soll kurz hingewiesen werden.

Um das Coffein aus dem Kaffee herauszulösen, wird in vielen Fällen zuerst ein wässeriger Extrakt hergestellt, indem man eine gewogene Menge Kaffeepulver mit Wasser kocht und einen aliquoten Teil des wässerigen Auszuges weiterverarbeitet. Gerösteter Kaffee ist jedoch ein gutes Adsorptionsmittel für Coffein. Ein Teil des Coffeins bleibt hartnäckig am Kaffeesatz adsorbiert, was zu Verlusten führt, worauf bereits *Hadorn* und *Jungkunz* (6) hingewiesen haben.

Einige Autoren wie *Barbera* (12) und *Albanese* (14) empfehlen eine Reinigung des wässerigen Auszuges mit Magnesiumoxid, entweder indem die wässerige Lösung mit Magnesiumoxid gekocht, oder durch eine Säule mit Magnesiumoxid filtriert wird. Es besteht die Gefahr, daß ein Teil des Coffeins oder einer Coffein-Komplexverbindung an Magnesiumoxid adsorbiert wird, was ebenfalls zu Verlusten führt. Der sichere Beweis, daß keine Adsorption stattfindet, ist schwierig zu erbringen.

Häufig wird das Coffein mit Chloroform extrahiert. Beim Abdestillieren des Lösungsmittels und beim Erwärmen im Trockenschrank von neutralen oder basischen Coffein-Auszügen können ganz erhebliche Coffein-Verluste infolge Zersetzung und Nebenreaktionen auftreten.

Zahlreiche Autoren führen am Schluß der Analyse eine Stickstoff-Bestimmung nach *Kjeldahl* aus und berechnen hieraus das Coffein. Stickstoffhaltige Verunreinigungen werden dabei ebenfalls erfaßt und täuschen Coffein vor. Nach anderen Methoden wir das Coffein aus einer weitgehend gereinigten Lösung mit Jodlösung als Coffein-Perjodid ausgefällt und titrimetrisch (13, 14) oder spektralphotometrisch (15, 8) bestimmt. Diese Verfahren sind auch nicht immer ganz zuverlässig. Einerseits werden gewisse Verunreinigungen mit Jod ebenfalls ausgefällt, anderseits ist das Coffein-Perjodid in Wasser merklich löslich, was Verluste verursacht, die berücksichtigt werden müssen. Nach den modernsten Methoden wird das Coffein UV-spektrophotometrisch bestimmt. Die spekrophotometrische Methode ist im Prinzip äußerst einfach und empfindlich, da Coffein ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 272 mμ aufweist. Das nach den bisher bekannten Methoden aus Kaffee isolierte Coffein ist meistens mit wechselnden Mengen anderer Stoffe verunreinigt, die im UV ebenfalls absorbieren und unter Umständen recht beträchtliche Mengen Coffein vortäuschen.

Albanese (14) charakterisiert in einer kürzlich erschienenen Arbeit die verschiedenen Coffein-Bestimmungsmethoden und gibt die Arbeitsbedingungen tabellarisch wieder. Er berichtet über vergleichende Untersuchungen, die im Zentrallabor der HAG-AG Bremen an 5 entcoffeinierten Kaffeesorten nach 11 verschiedenen Methoden oder Varianten durchgeführt worden sind. Die an ein und derselben Kaffeeprobe nach verschiedenen Methoden gefundenen Coffein-Gehalte variieren sehr stark. Die Werte sind gelegentlich, je nach Methoden, um das 2- bis 5fache verschieden. Auf Grund dieser Untersuchungen empfiehlt *Albanese* für Routineuntersuchungen und als Betriebsmethode eine eigene Schnellmethode, deren Resultate gut mit den nach der Methode *Bower* (7) und der Methode *Barbera* (12) übereinstimmen sollen. Ein analoges Verfahren wird von *Albanese* (16) für coffeinfreie Kaffee-Extrakte beschrieben. Welche Methode die zuverlässigsten, d. h. dem wahren Coffein-Gehalt der Probe am nächsten liegenden Werte liefert, geht aus der Arbeit von *Albanese* nicht hervor, weil die «wahren» Coffein-Gehalte der untersuchten Proben nicht bekannt sind. Um die Brauchbarkeit der verschiedenen Methoden abzuschätzen, müßte man unbedingt eine zuverlässige Methode besitzen, die Resultate liefert, die dem wahren Coffein-Gehalt des Untersuchungsmaterials möglichst nahe kommen.

Die spektrophotometrische Bestimmung von Coffein in reinen Lösungen ist mit modernen UV-Spektralphotometern sehr einfach und genau. Die Hauptschwierigkeit bei allen UV-spektrophotometrischen Bestimmungen besteht darin, alle Begleitstoffe, die im UV meistens ebenfalls absorbieren, vollständig zu entfernen.

Unsere neue, spektrophotometrische Methode unterscheidet sich in einigen wesentlichen Punkten von den meisten bisher üblichen Verfahren. Wir haben einige bereits mehr oder weniger bekannte Operationen kombiniert, so daß schließ-

lich das im Untersuchungsmaterial vorhandene Coffein quantitativ und rein in der auszumessenden Lösung vorliegt. In dieser Arbeit wird die neue Methode in allen Einzelheiten systematisch überprüft, um die optimalen Versuchsbedingungen festzulegen. Durch Modellversuche wird die Richtigkeit und Zuverlässigkeit bewiesen. Zahlreiche Analysen von coffeinhaltigem und entcoffeiniertem Bohnenkaffee sowie von Kaffee-Extrakten geben Aufschluß über die Versuchsstreuung.

1. Prinzip der Aufschlußmethode

In einer ersten Stufe wird das Untersuchungsmaterial mit konz. Schwefelsäure bei ca. 200 ° C aufgeschlossen. Während dieser Operation, die erstmals von *Cortes* (17) empfohlen, dann von *Hadorn* und *Suter* (8) übernommen wurde, verkohlt die organische Substanz weitgehend. Das Coffein wird dabei nicht angegriffen.

In einer zweiten Operation wird das mit Wasser verdünnte Aufschluß-Gemisch samt Kohle in einen Perforator übergeführt und das Coffein mit Chloroform quantitativ perforiert.

Nach dem Abdestillieren des Chloroforms hinterbleibt bereits ziemlich reines Coffein. Dieses muß noch gereinigt werden. Gut bewährt hat sich eine chromatographische Reinigung an einer kombinierten Säule mit basischem Aluminiumoxid, die in der obersten Zone mit Natronlauge befeuchtet ist. Als Elutionsmittel diente Chloroform. Das Coffein wird schließlich in Wasser gelöst und im UV spektrophotometrisch bestimmt.

2. Spektrophotometrische Coffein-Bestimmung

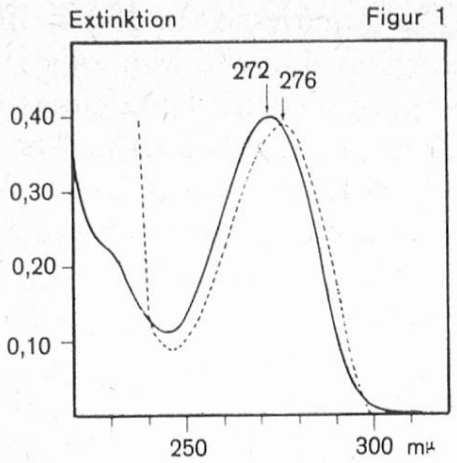
a) *Absorptionsspektren*

Coffein, gelöst in Wasser oder in sehr verdünnter Säure zeigt eine charakteristische Absorptionsbande im UV mit einem Absorptionsmaximum bei 272 mμ. In Chloroform als Lösungsmittel erhält man eine ähnliche Absorptionskurve, die Extinktion ist etwas geringer und die ganze Absorptionsbande ist etwas nach dem längeren Wellenlängenbereich verschoben, mit einem Maximum bei 276 mμ (siehe Figur 1). Die Lichtabsorption gehorcht über einen großen Konzentrationsbereich dem *Beerschen* Gesetz.

Wir fanden folgende Konstanten:

In Waser oder 0,01 % Schwefelsäure	(Maximum bei 272 mμ) $E^{1\,\%}_{1\,cm}$	= 500
In Chloroform	(Maximum bei 276 mμ) $E^{1\,\%}_{1\,cm}$	= 485

Obige Mittelwerte aus mehreren Messungen stimmen gut mit den Angaben von *Vercillo* und *Manzone* (18) überein.



UV-Absorptionsspektren von Coffein

——— 0,8 mg Coffein in 100 ml Wasser
- - - - 0,8 mg Coffein in 100 ml Chloroform

b) *Einfluß von Säuren und Lauge*

Im Prinzip ist es gleichgültig, ob man die spektrophotometrische Bestimmung des Coffeins in Chloroform oder in wässeriger Lösung ausführt. Die Erfahrung hat aber gezeigt, daß dem aus Kaffee isolierten Coffein meist noch Spuren lipoidartiger Stoffe anhaften, die im UV ebenfalls absorbieren und daher in Chloroformlösung stören. Durch Lösen des Coffeins in Wasser oder Schwefelsäure lassen sich diese Verunreinigungen abtrennen. Wir haben uns deshalb auf wässerige Lösungen beschränkt. Eigene Versuche zeigten, daß das Absorptionsspektrum und die Extinktion des Coffeins gleich bleiben, wenn in neutraler, schwach saurer oder schwach ammoniakalischer Lösung ausgemessen wird. Da wir später in einigen Versuchen den Coffein-Lipoid-Rückstand mit Schwefelsäure lösten bzw. hydrolysierten, mußte noch der Einfluß der Schwefelsäurekonzentration auf die Extinktion geprüft werden. Höhere Schwefelsäurekonzentrationen (1—2 %) vermindern die Extinktion des Coffeins etwas und verschieben das Maximum minim nach kürzeren Wellenlängen. Aus den Resultaten der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß bei Konzentrationen zwischen 0 und 0,1 % Schwefelsäure in der Endlösung die Extinktion des Coffeins nur unmerklich verändert wird.

Tabelle 1

Einfluß der Schwefelsäurekonzentration auf die Extinktion des Coffeins

mg Coffein in 100 ml Lösung	Schwefelsäure-konzentration in der Endlösung %	Extinktion bei 272 mμ	Gef. Coffein-Gehalt in % des theoret. Wertes
0,80	0	0,400	100
0,80	0,05	0,400	100
0,80	0,1	0,398	99,5
0,80	0,2	0,397	99,3
0,80	0,3	0,395	98,7
0,80	1,0	0,398	97,2
0,80	2,0	0,374	93,6

In den meisten Versuchen haben wir die Schwefelsäurekonzentration niedrig (0,01 bis 0,02 %) gehalten, so daß wir die gleiche Eichkurve wie in Wasser benützen konnten.

3. Verhalten des Coffeins beim Schwefelsäure-Aufschluß

Durch den Aufschluß mit konzentrierter Schwefelsäure verkohlt die organische Substanz weitgehend. Das Coffein wird dabei nicht verändert. Bei der anschließenden Extraktion der verdünnten schwefelsauren Lösung mit Chloroform gelangen neben Coffein stets noch wechselnde Mengen gelbbraun gefärbter Verunreinigungen in den Chlororform-Extrakt.

Es hat sich nun gezeigt, daß bei höherer Aufschlußtemperatur oder längerer Aufschlußzeit die Anteile an Verunreinigungen stark vermindert werden, da sie offenbar weitgehend durch die Schwefelsäure zerstört werden. Es sollten die optimalen Bedingungen gefunden werden, unter denen die störenden Begleitstoffe möglichst vollständig zerstört, das Coffein jedoch noch nicht zersetzt wird.

a) *Schwefelsäure-Menge*

Der Schwefelsäure-Aufschluß entspricht der Anfangsphase einer *Kjeldahl*-Bestimmung. Unter dem Einfluß der konzentrierten Schwefelsäure werden die organischen Stoffe des Kaffees weitgehend zersetzt. Zum Teil werden sie oxydiert, zum Teil verkohlen sie.

Cortes (17) behandelt 1 g fein gepulverten Kaffee mit 2 ml konzentrierter Schwefelsäure auf dem Wasserbad. Je nach dem Verhältnis von Schwefelsäure zu Substanz verläuft der Aufschluß etwas verschieden. Mit geringen Mengen Schwefelsäure (Verhältnis 1:2) erhält man eine grobe und sehr harte Kohle. Hieraus läßt sich das eingeschlossene Coffein bei der Perforation nur sehr langsam und oft unvollständig extrahieren. Das isolierte Coffein ist farblos und ziemlich rein. Mit viel Schwefelsäure (5 ml) dagegen bleibt das Reaktionsgemisch flüssig, nach dem Verdünnen erhält man eine sehr feine Kohle, aus der sich das Coffein besser extrahieren läßt. Aus derartigen Aufschlüssen erhält man ein ziemlich stark verunreinigtes Coffein und während der Perforation treten gelegentlich lästige Emulsionen auf. Diese lassen sich in der Regel durch Aufkochen der Lösung verhindern. Nach zahlreichen Versuchen erwies sich folgendes Aufschlußverfahren als besonders günstig: Der Kaffee wird zunächst mit möglichst wenig Säure aufgeschlossen (auf 1 Gewichtsteil Kaffee 2 Volumen Teile konzentrierter Schwefelsäure). Dabei entsteht eine trockene Kohle und die Verunreinigungen werden zersetzt. Gegen den Schluß, d. h. nach 10 bis 15 Minuten fügt man noch 2 ml Schwefelsäure zu und erhitzt noch während ca. 10 Minuten. Die Kohle bildet nun eine weiche Masse, die sich nach dem Verdünnen mit Wasser gut perforieren läßt.

b) *Aufschlußtemperatur*

Unter den Aufschlußbedingungen nach *Cortes* mit konzentrierter Schwefelsäure bei Wasserbadtemperatur entstehen verschiedene Nebenprodukte. Bei der anschließenden Perforation mit Chloroform gelangen beträchtliche Mengen gelber und brauner Verunreinigungen in das Coffein. Durch Erhöhung der Aufschlußtemperatur können diese Verunreinigungen weitgehend zerstört werden. Es mußte geprüft werden, wie hoch überhaupt erhitzt werden darf, ohne daß dabei Coffein zersetzt wird.

In einem entcoffeinierten Kaffee-Extrakt haben wir den Aufschluß in einem Luftbad mit Thermometer bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt und jeweils den Coffein-Gehalt nach der am Schluß der Arbeit beschriebenen Vorschrift bestimmt.

Tabelle 2 Einfluß der Aufschlußtemperatur

Je 500 mg entcoffeinierter Kaffee-Extrakt wurden mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure während 20 Minuten erhitzt, dann 2 ml konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und während weiteren 10 Minuten erhitzt.

Nr.	Aufschlußtemperatur	% Coffein im Ausgangsmaterial	Aussehen des Chloroform-Extraktes
1	95 ° C	0,135	intensiv gelb
2	200 ° C	0,132	farblos
3	250 ° C	0,111	schwach gelblich
4	300 ° C	0,020	intensiv gelb

Aus den Resultaten der Tabelle 2 geht hervor, daß bei Temperaturen bis 200 ° C keine Zersetzung des Coffeins erfolgt. Bei 250 ° C macht sich bereits eine geringe Zersetzung bemerkbar und bei 300 ° C wird das Coffein zum größten Teil zerstört. Als optimal für den Aufschluß erwies sich eine Temperatur von 180 bis 200 ° C.

c) *Aufschlußzeit*

Um zu prüfen, ob die Aufschlußzeit einen Einfluß auf das Resultat hat, haben wir je 500 mg eines coffeinfreien Kaffee-Extraktes mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure während verschiedenen Zeiten bei 180—200 ° C aufgeschlossen, dann noch 2 ml Schwefelsäure zugesetzt und weitere 10 Minuten erhitzt. Die Resultate sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Nach 10—20 Minuten langer Erhitzung sind keine Coffein-Verluste zu beobachten. Bei 30 Minuten langer Erhitzung mit 1 ml Schwefelsäure wird die Masse völlig trocken, weil die Schwefelsäure teilweise für die Oxydation der organischen Substanz verbraucht wird. Dabei sind bereits geringe Coffein-Verluste zu beobachten. Bei 60 Minuten langer Erhitzung der trockenen Masse gehen merkliche Mengen Coffein, vermutlich infolge Verflüchtigung, verloren. Nach der end-

gültigen Vorschrift, nach welcher 10—15 Minuten erhitzt wird, finden keine Verluste statt, wie durch Modellversuche mit reinem Coffein und mit Mischungen von Cichorie und Coffein bewiesen wird.

Tabelle 3 Einfluß der Aufschlußzeit

Je 500 mg eines entcoffeinierten Kaffee-Extraktes wurden mit Schwefelsäure unter wechselnden Bedingungen aufgeschlossen.

Versuch Nr.	1. Erhitzung mit 1 ml H_2SO_4 Minuten	2. Erhitzung nach Zusatz von 2 ml H_2SO_4 Minuten	% Coffein
1	10	10	0,129
2	15	10	0,131
3	20	10	0,129
3a	20	10	0,129
4	30	10	0,125
5	60	10	0,108

d) *Modellversuch mit reinem Coffein*

Um zu beweisen, daß beim Schwefelsäure-Aufschluß kein Coffein zersetzt oder umgewandelt wird, haben wir in einem Modellversuch 0,786 mg Coffein mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure während 30 Minuten auf 180—200 ° C erhitzt. Anschließend wurde wie üblich perforiert, chromatographisch gereinigt und die Lösung spektrophotometrisch ausgemessen. Die Coffein-Ausbeute betrug 99,6 %. Das Absorptionsspektrum dieser Lösung war identisch mit demjenigen einer reinen Coffein-Lösung. Nach unserem Analysengang erhält man somit in der Endlösung das Coffein quantitativ.

4. Ausschütteln bzw. Perforieren des Coffeins

Nach beendetem Aufschluß mit Schwefelsäure wird die abgekühlte Flüssigkeit mit Wasser verdünnt. Aus dieser wässerigen Flüssigkeit, die viel fein verteilte Kohle enthält, muß nun das Coffein quantitativ extrahiert werden. Da die Kohle das Coffein adsorbiert, ist die quantitative Extraktion ziemlich zeitraubend.

a) *Ausschütteln im Scheidetrichter*

Wir versuchten, das Coffein durch wiederholtes Ausschütteln mit Chloroform im Scheidetrichter aus der kohlehaltigen Aufschlußflüssigkeit auszuziehen. Nach 6 Ausschüttlungen mit je 50 ml Chloroform waren erst 78 % des vorhandenen Coffeins extrahiert. Die Operation ist viel zu zeitraubend, zudem ist die Schichtentrennung unbefriedigend.

Tabelle 4

Coffein-Ausbeute beim Perforieren mit Chloroform und mit Dichloräthylen in saurem und alkalischem Milieu

Je 500 mg Röstkaffee wurden zunächst während 15 Minuten mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure bei 180—200 ° C aufgeschlossen, dann weitere 2 ml Schwefelsäure zugefügt und während 10 Minuten weiter erhitzt. Das mit Wasser verdünnte Aufschlußgemisch wurde unter wechselnden Bedingungen perforiert.

Coffein-Ausbeute		Perforation mit $CHCl_3$		Perforation mit $C_2H_2Cl_2$	
		Sauer	Soda-alkalisch	Sauer	Soda-alkalisch
Nach 2 Stunden Perforieren	mg	5,60	1,98	5,02	1,80
Nach weiteren 2 Stunden	mg	0,25	1,75	0,63	1,42
Total nach 4 Stunden	mg	5,85	3,73	5,65	3,22
Ausbeute nach 4 Stunden in %		100	63,8	96,6	55,1

b) *Perforieren*

Wir haben daher die Aufschlußflüssigkeit samt Kohle quantitativ in einen Perforator nach *Pritzker* und *Jungkunz* (19) übergeführt und mit verschiedenen Lösungsmitteln, wie Chloroform, Dichloräthylen und Tetrachlorkohlenstoff perforiert. Tetrachlorkohlenstoff erwies sich als am ungünstigsten. Nach 6stündigem Perforieren (aus saurer Lösung), wenn mit Chloroform bereits das gesamte Coffein entzogen ist, werden mit Tetrachlorkohlenstoff nur 80 % des Coffeins erhalten. Im Prinzip kann das Coffein mit Chloroform sowohl aus saurer als auch aus alkalischer Lösung ausgezogen werden. Diesbezügliche Perforationsversuche mit Chloroform und Dichloräthylen sind in der Tabelle 4 zusammengestellt. Aus den Resultaten ist klar ersichtlich, daß die Perforation aus soda-alkalischer Lösung viel zeitraubender ist und nicht in Frage kommt. Mit Chloroform ist nach 4 Stunden das Coffein praktisch quantitativ entzogen, mit Dichloräthylen geht die Perforation bedeutend langsamer.

In der Tabelle 5 finden sich die Resultate von 3 weiteren Perforationsversuchen mit einem gewöhnlichen Röstkaffee, einem entcoffeiniertem Kaffee-Extrakt und einem Modellversuch, bestehend aus Cichorie und reinem Coffein.

Der Schwefelsäure-Aufschluß erfolgte nach der im Abschnitt «Methodik» beschriebenen Weise. Perforiert wurde mit Chloroform in schwefelsaurer Lösung. Jede Stunde wurden die Kölbchen am Perforator ausgewechselt und die einzelnen Perforationsrückstände getrennt nach der im Abschnitt «Methodik» beschriebenen Vorschrift aufgearbeitet und darin die Coffein-Menge bestimmt. Die Kohle im Perforator wurde stündlich einmal aufgerührt. Die Versuche zeigen, daß sich die Resultate asymptotisch einem Endwert nähern (siehe Figur 2). Die Perforation kann nach 4—5 Stunden abgebrochen werden, da nach dieser Zeit die Coffein-Ausbeute 98—99 % beträgt.

Tabelle 5 Einfluß der Perforationszeit

Perforation mit Chloroform in schwefelsaurer Lösung

Perforationszeit Stunden	Röstkaffee (Einwaage = 503,4 mg)		Entcoffeinierter Kaffee-Extrakt (Einwaage = 500,9 mg)		Modellversuch 500 mg Cichorie 14,75 mg Coffein	
	Coffein mg	Ausbeute %	Coffein mg	Ausbeute %	Coffein mg	Ausbeute %
1	—	—	—	—	11,60	78,6
2	5,10	86,5	0,590	84,4	13,72	93,0
3	5,625	95,4	0,605	96,9	14,27	96,8
4	5,794	98,3	0,615	98,4	14,49	98,2
6	5,899	100*	0,625	100*	14,61	99,1
9	—	—	—	—	14,67	99,5

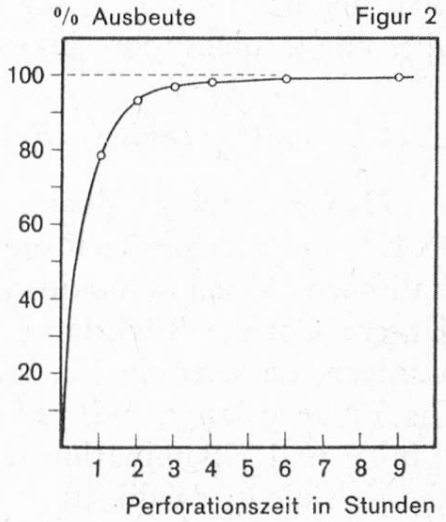
* Die nach 6 Stunden erhaltene Coffeinmenge wurde willkürlich als 100 % angenommen. Die noch in der wässerigen Lösung befindlichen Coffein-Spuren können vernachlässigt werden.

5. Reinigung der Chloroform-Extrakte

Wir haben verschiedene Reinigungsoperationen systematisch überprüft.

a) *Nochmaliger Schwefelsäure-Aufschluß*

Der wenige Miligramme betragende Rückstand mit dem Roh-Coffein wurde mit 1—2 ml konzentrierter Schwefelsäure vermischt und auf dem Luftbad nochmals während $^1/_2$ Stunde auf 180 ° C erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit Wasser verdünnt und das Coffein mit Chloroform ausgeschüttelt. Die gelb gefärbten Verunreinigungen waren bei diesem zweiten Säureaufschluß nicht zerstört worden.



Coffeinausbeute als Funktion der Perforationszeit

b) *Oxydation in wässeriger Lösung mit Permanganat*

Wir haben versucht, die störenden Begleitstoffe durch Oxydation mit Kaliumpermanganat in wässeriger Lösung zu oxydieren, wie dies verschiedene Autoren (1, 3, 9, 10) vorschlagen. Zur Entfernung des Überschusses an Kaliumpermanganat und des entstandenen Mangan-IV-hydroxids haben wir Versuche mit schwefliger Säure, mit Wasserstoffperoxid und mit Hydroxylamin angestellt. Modellversuche zeigten, daß die ursprünglich gelblichen Lösungen durch die Permanganat-Reini-

gung vollständig entfärbt und das Coffein dabei nicht angegriffen wurde. Schweflige Säure und Wasserstoffperoxid erwiesen sich als ungünstig zur Entfernung des Permanganat-Überschusses, weil beide Reagenzien mit Coffein eine Erhöhung der Extinktion bei 272 mμ verursachten. Mit Hydroxylamin war dies nicht der Fall. Wurden in Modellversuchen reine Coffein-Lösungen in schwefelsaurer Lösung mit Kaliumpermanganat behandelt und mit Hydroxylaminsulfat entfärbt, fand man vor und nach der Behandlung die gleiche Extinktion bei 272 mμ.

In der Praxis erwies sich die Permanganat-Reinigung jedoch als unbrauchbar. Die gelb gefärbten Verunreinigungen werden zwar vollständig entfärbt. Die spektrophotometrische Messung im UV bei 272 mμ gab jedoch ausnahmslos zu hohe Coffein-Werte. Vermutlich werden gerade jene Verunreinigungen, die im UV-Licht eine merkliche Absorption zeigen, durch die Oxydation mit Permanganat nicht zerstört.

c) *Reinigung mit Carrez-Lösung*

Durch eine Reinigung mit Carrez-Lösung (je 0,5 ml Carrez I und II auf 50 ml Endlösung), die von *Manelli* und *Mancini* (9) empfohlen wird, lassen sich die gefärbten Verunreinigungen und andere störende Stoffe weitgehend entfernen. Diese Reinigung der Coffein-Auszüge in wässeriger Lösung führte nicht zum Ziel, weil der nach der Klärung in der Lösung verbleibende Überschuß an Zinksulfat eine starke, nicht reproduzierbare Erhöhung der Extinktion bei 272 mμ verursacht.

d) *Chromatographische Reinigung*

Hadorn und Jungkunz (6) haben das nach einer anderen Methode erhaltene Roh-Coffein erfolgreich durch chromatographische Reinigung an einer ammoniakalischen Aluminiumoxid-Säule gereinigt. Als Lösungsmittel diente Chloroform. Unsere Coffein-Rückstände ließen sich nach dieser Methode nicht befriedigend reinigen, da stets ein Teil der gelben Verunreinigungen durch die Säule hindurch ins Eluat gelangt. Wir haben mit wechselndem Erfolg die verschiedenartigsten Säulen und Kombinationen ausprobiert. Säulen mit Kieselgel und Celit bewährten sich nicht, da dieselben stets merkliche Mengen von UV-absorbierenden Stoffen an Chloroform abgaben. Auch mit dem ammoniakalischen Chloroform, das *Hadorn* und *Jungkunz* empfehlen, haben wir gelegentlich Mißerfolge beobachtet. Beim Aufbewahren des mit Ammoniak gesättigten Chloroforms verflüchtigt sich das Ammoniak allmählich. Schließlich reicht der Ammoniak-Gehalt nicht mehr aus, um die Aluminiumoxid-Säule genügend ammoniakalisch zu machen, wodurch das Eluieren des Coffeins stark verzögert wird (siehe Tabelle 6).

Am besten bewährt hat sich schließlich eine kombinierte Säule aus basischem Aluminiumoxid (Al_2O_3 mit 1 % Natriumkarbonatlösung behandelt, abfiltriert, getrocknet und geglüht). Als Elutionsmittel diente reines Chloroform. Vor der Benützung wurde die Säule im obern Teil in einer Länge von 1—2 cm mit 10%iger Natronlauge befeuchtet. Die frische Säule gibt, nachdem sie mit 10 ml Chloroform durchgespült worden war, keine Spur von Substanzen ab, die im UV absorbieren.

Das UV-Absorptionsspektrum einer durch obige Säule filtrierten, reinen Coffein-Lösung war identisch mit demjenigen einer nicht chromatographierten reinen Coffein-Lösung. Wird der etwas eingeengte Chloroformauszug mit dem Roh-Coffein durch diese Säule filtriert, bleibt ein Teil der Verunreinigungen in der obersten Zone, d. h. in der Laugenschicht zurück. Spuren von gewissen gelben Verunreinigungen wandern durch die wässerige Laugenschicht hindurch, sie werden aber unmittelbar darunter in der obersten Zone des wasserfreien Aluminiumoxids adsorbiert. Das durch die Säule austretende Eluat ist vollständig farblos und hinterläßt nach dem Abdestillieren des Chloroforms rein weißes, schön kristallisiertes Coffein. Das Eluieren des Coffeins aus der basischen Aluminiumoxid-Säule gelingt sehr gut und quantitativ, wie die Modellversuche in Tabelle 6 zeigen.

Tabelle 6 Eluieren von Coffein aus verschiedenen Säulen

Genau abgewogene Mengen Coffein wurden in Chloroform gelöst, durch die Säule filtriert und mit Chloroform eluiert. Das Eluat wurde fraktionenweise aufgefangen und in jeder Fraktion das eluierte Coffein bestimmt.

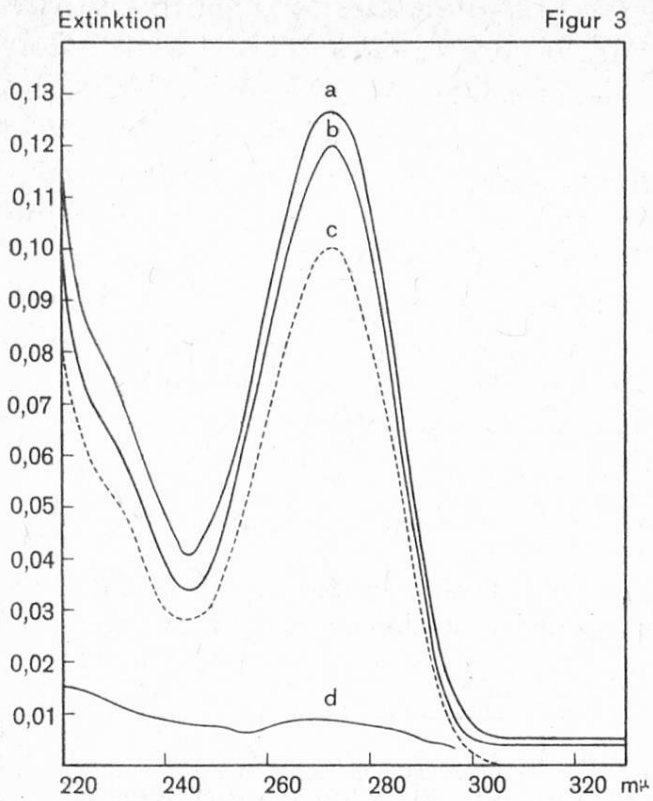
Fraktion = ml Eluat	Ammoniakalische Säule 4 g Al_2O_3 mit 10 ml ammoniakalischem Chloroform getränkt		Kombinierte basische Säule 4 g bas. Al_2O_3 + 0,7 ml 10 % NaOH (oben)			
	eingesetzt 10,85 mg Coffein		eingesetzt 10,65 mg Coffein		eingesetzt 0,838 mg Coffein	
	gefunden mg	%	gefunden mg	%	gefunden mg	%
10	6,84	63	8,90	83,6	—	—
20	9,94	91,5	10,60	99,6	—	—
30	10,29	94,9	10,61	99,8	0,838	100,0
40	10,33	95,5	10,61	99,8	0,838	100,0
50	10,35	95,6	—	—	—	—
60	10,36	95,6	—	—	—	—

Aus der kombinierten basischen Aluminiumoxid-Säule wurden Coffein-Mengen zwischen 0,8 und 10 mg rasch und quantitativ eluiert, während sich aus der ammoniakalischen Säule gelegentlich die letzten Anteile des Coffeins nur langsam eluieren lassen.

Wie sich erst später zeigte, ist das aus Kaffee isolierte und chromatographisch gereinigte Coffein meistens noch mit Spuren von farblosen, lipoidlöslichen Stoffen verunreinigt, die im UV eine geringe Absorption zeigen. Über die Eigenschaften dieser Verunreinigungen und deren Entfernung wird in einem späteren Abschnitt ausführlich berichtet.

e) *Spektrophotometrische Reinheitsprüfung der Coffein-Lösung*

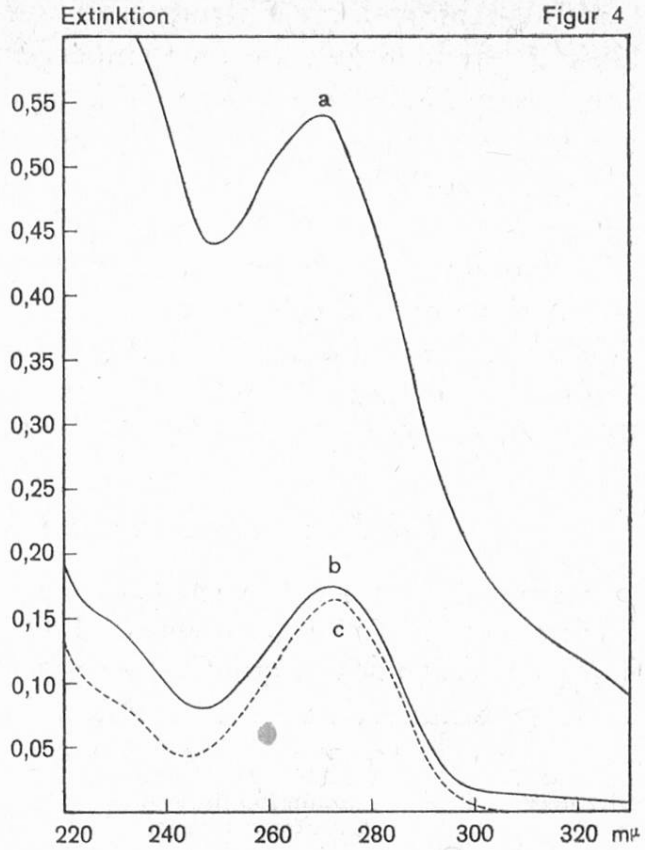
Die UV-spektrophotometrische Bestimmung liefert nur richtige Werte, wenn die ausgemessene, verdünnte Coffein-Lösung rein ist, d. h. keine Verunreinigungen



Gewöhnlicher Rohkaffee

UV-Absorptionsspektren des Chloroform-Auszuges eines Schwefelsäure-Aufschlusses in Wasser

a) Vor chromatographischer Reinigung
b) Nach chromatographischer Reinigung
d) Differenz zwischen Kurve a und b (Untergrund)
c) UV-Spektrum von 200 mg reinem Coffein in 100 ml Wasser



Entcoffeinierter Röstkaffee

UV-Absorptionsspektren des Chloroformauszuges eines Schwefelsäure-Aufschlusses in Wasser

a) vor chromatographischer Reinigung
b) nach chromatographischer Reinigung
c) reines Coffein

enthält, die bei 272 mμ ebenfalls absorbieren. Eine zuverlässige Kontrolle über die Reinheit des Coffeins gibt das UV-Absorptionsspektrum. Wenn absorbierende Verunreinigungen vorhanden sind, erscheint die Kurve etwas erhöht. Um dies zu demonstrieren, haben wir die Absorptionsspektren der Coffein-Auszüge aus Kaffee vor und nach chromatographischer Reinigung verglichen. 207 mg eines nicht entcoffeinierten Röstkaffees wurden wie üblich mit konzentrierter Schwefelsäure bei 200 ° C aufgeschlossen und das Coffein perforiert. Der Chloroformauszug wurde in zwei gleiche Teile geteilt. Die eine Hälfte wurde an einer kombinierten basischen Aluminiumoxidsäule gereinigt, das Chloroform vorsichtig abdestilliert und der Rückstand in 500 ml Wasser gelöst und das UV-Absorptionsspektrum aufgenommen. Die andere Hälfte wurde analog, jedoch ohne chromatographische Reinigung in Wasser gelöst und ausgemessen.

In der Figur 3 sind die beiden Absorptionskurven dargestellt. Beide Kurven sind ähnlich. Die Kurve a vor der chromatographischen Reinigung ist gegenüber der Kurve b des gereinigten Coffeins etwas überhöht, was besonders deutlich im Absorptionsminimum bei 246 mμ und im langwelligen UV bei 300 mμ erkennbar ist. Auf Grund der Messung im Absorptionsmaximum würde in unserem Beispiel der Coffein-Gehalt um 5,8 % relativ zu hoch ausfallen. Die Überhöhung stammt von absorbierenden Verunreinigungen her, die bei der chromatographischen Reinigung entfernt werden. Kurve d stellt die Differenz der beiden Kurven, den sogenannten «Untergrund» dar. Zum Vergleich ist auch das Absorptionsspektrum von chemisch reinem Coffein eingezeichnet (Kurve c).

Analoge Versuche wurden mit einem entcoffeinierten Röstkaffee (522 mg) durchgeführt. Das Coffein wurde jeweils in 25 ml Wasser gelöst (siehe Figur 4). Hier sind die Unterschiede viel ausgeprägter. Die Absorptionskurve vor der chromatographischen Reinigung ist stark überhöht, weil im Verhältnis zum Coffein viel mehr Verunreinigungen vorhanden sind. Aus der Kurve a in Figur 4 ließe sich ein um das dreifache zu hoher Coffein-Gehalt errechnen. Nach der chromatographischen Reinigung erhält man ebenfalls ziemlich reines Coffein. Das Absorptionsspektrum (Kurve b) läßt allerdings noch auf geringe Mengen von Verunreinigungen schließen, da die Kurve im kurzwelligen UV, sowie im langwelligen Bereich bei 300 mμ gegenüber reinem Coffein (Kurve c) deutlich überhöht ist. Es ist keineswegs nötig, zur Kontrolle der Reinheit der Coffein-Lösungen immer die ganze Absorptionskurve aufzunehmen. Es genügen 1 oder 2 Kontrollmessungen. Man bildet zweckmäßig bestimmte Verhältniszahlen. Bei reinem Coffein beträgt beispielsweise die Extinktion im Absorptionsminimum 26,5 % derjenigen im Absorptionsmaximum. Es gilt folgende Beziehung:

$$\frac{E_{246}}{E_{272}} \cdot 100 = 26{,}5$$

Im langwelligen Bereich bei 300 mμ gilt für reines Coffein folgende Relation:

$$\frac{E_{300}}{E_{272}} \cdot 100 = 2{,}0$$

In der Tabelle 7 sind diese Relationen für reines Coffein, sowie für verschiedene, mehr oder weniger gereinigte Auszüge aus Kaffee-Produkten zusammengestellt.

Bei den Modellversuchen 2 und 3, in welchen bekannte Mengen Cichorie und Coffein zusammen aufgeschlossen und aufgearbeitet worden sind, fanden wir nahezu die theoretischen Coffein-Mengen wieder. Das Coffein war praktisch rein, die beiden Relationen sind gegenüber chemisch reinem Coffein nur unbedeutend erhöht. Beim Modellversuch 4, in welchem der Coffeingehalt im Verhältnis zur Cichorie-Menge extrem niedrig war, erwies sich das isolierte Coffein als nicht ganz rein. Die beiden Relationen sind deutlich erhöht und wir fanden einen um 5 % zu hohen Coffein-Gehalt. Bezogen auf den Coffein-Gehalt im Ausgangs-

material fällt dieser Fehler allerdings nicht stark ins Gewicht. Wir fanden 0,042 % statt 0,040 % Coffein.

Die Versuche 5 und 6 wurden bereits als Absorptionskurven in den Figuren 3 und 4 dargestellt. Sie veranschaulichen den Einfluß der chromatographischen Reinigung. Beim nicht entcoffeinierten Röstkaffee wird nach der chromatographischen Reinigung wiederum sehr reines Coffein erhalten. Ohne chromatographische Reinigung sind die beiden Relationen deutlich erhöht und der Coffein-Gehalt fällt etwas hoch aus. Beim entcoffeinierten Röstkaffee ist das Coffein vor der chromatographischen Reinigung sehr stark verunreinigt. Nach chromatographischer Reinigung liegt der Quotient $\frac{E_{300}}{E_{272}}$ bei 9 %.

Die Praxis hat ergeben, daß man nach unserer Vorschrift bei allen nicht entcoffeinierten Kaffeprodukten sehr reines Coffein erhält. Das aus entcoffeinierten Produkten isolierte Coffein ist meistens mit geringen Mengen anderer Stoffe verunreinigt. Der Quotient $\frac{E_{300}}{E_{272}} \cdot 100$ ist daher etwas erhöht. Solange dieser Quotient unter 10 % liegt, sind die Resultate brauchbar und nicht verfälscht. Sie können um ca. 5 % relativ zu hoch liegen.

Die Erhöhung der Absorptionskurve durch gewisse Verunreinigungen, die einen «Untergrund» verursachen, läßt sich rechnerisch oder graphisch nach dem sogenannten «Grundlinienverfahren» (22) korrigieren. Über dieses Korrekturverfahren hat *Smith* (20) anläßlich des internationalen Kolloquiums in Paris berichtet.

In dieser Arbeit wird auf diese Korrektur nicht näher eingegangen. Sie soll später in einem anderen Zusammenhang ausführlich besprochen werden.

Über lipoidlösliche Verunreinigungen und Nebenreaktionen des Coffeins

Nach der chromatographischen Reinigung durch die kombinierte basische Aluminiumoxid-Säule erhielten wir in allen Fällen völlig farbloses, gut kristallisierendes Coffein. Parallelbestimmungen lieferten in der Regel sehr gut reproduzierbare Resultate.

Ab und zu, besonders bei entcoffeiniertem Roh- und Röstkaffee traten gewisse Unstimmigkeiten auf. Im Prinzip müßte es gleichgültig sein, ob das Coffein in Chloroform oder in wässeriger Lösung spektrophotometrisch bestimmt wird. Das Ausmessen in Chloroform wäre einfacher, weil man nach der chromatographischen Reinigung das Eluat nur auf ein bestimmtes Volumen verdünnen müßte, während für die Messung in Wasser ein nochmaliges Abdestillieren des Chloroforms nötig ist. Aus den Resultaten der Tabelle 8 geht deutlich hervor, daß man in Chloroform höhere Coffein-Gehalte findet als in Wasser.

Diese Unstimmigkeiten, die sich hauptsächlich bei entcoffeinierten Produkten auswirken, sind auf geringe Mengen lipoidlöslicher (farbloser) Verunreinigungen zurückzuführen, die bei der Chromatographie mit dem Coffein ins Eluat gelangen.

Tabelle 7

Relationen der UV-Absorption von Coffein und verschiedenen gereinigten Auszügen

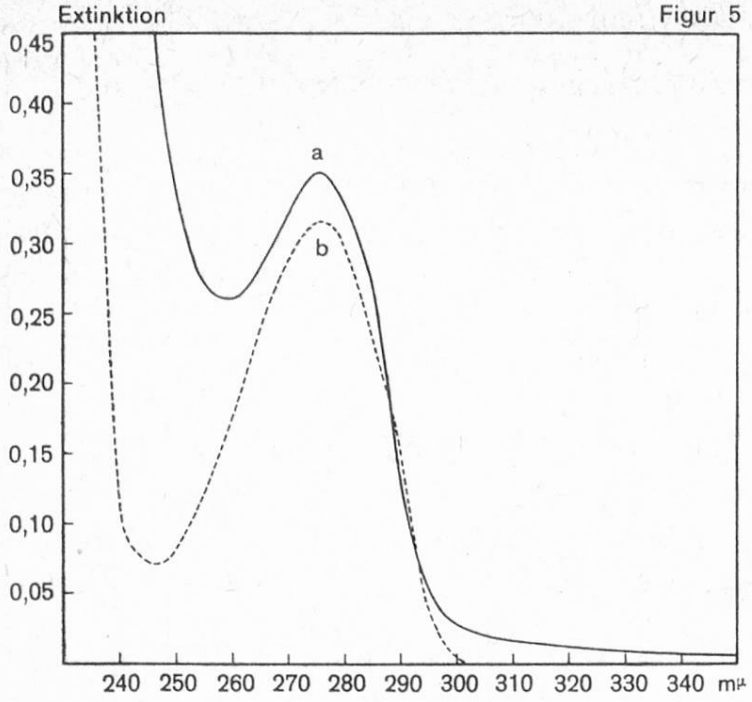
Nr.	Untersuchungsmaterial	Chromatographische Reinigung	$\frac{E_{246}}{E_{272}} \cdot 100$	$\frac{E_{300}}{E_{272}} \cdot 100$	Resultat (Coffein in mg oder in %)	Abweichung vom Sollwert in % relativ
1	Coffein, chemisch rein	—	26,7	2,0	100 %	0
2	Modellversuch 500 mg Cichorie 4,02 mg Coffein	ja	31,6	5,0	4,04 mg	+ 0,5
3	Modellversuch 500 mg Cichorie 0,80 mg Coffein	ja	27	2,5	0,796 mg	— 0,4
4	Modellversuch 500 mg Cichorie 0,20 mg Coffein	ja	50,5	11,9	0,210 mg	+ 5,0
5	Röstkaffee	ja	28	4,2	1,16 %	—
5a	Röstkaffee	nein	34	6,7	1,23 %	+ 5,8
6	Entcoffeinierter Röstkaffee	ja	46	9,2	0,0335 %	—
6a	Entcoffeinierter Röstkaffee	nein	85	36,5	0,102 %	+ 206

Tabelle 8

Spektrophotometrische Coffein-Bestimmung in Chloroform- und in wässeriger Lösung

Die aus Kaffee isolierten und chromatographisch gereinigten Auszüge wurden zunächst in Chloroform-Lösung bei 276 mμ ausgemessen. In einem aliquoten Teil wurde nach dem Verdunsten des Chloroforms das Coffein in Wasser aufgenommen und spektrophotometrisch bei 272 mμ bestimmt.

Produkt	Messung in Chloroform % Coffein	Messung in Wasser % Coffein
Entcoffeinierter Rohkaffee	0,069	0,034
Entcoffeinierter Röstkaffee	0,067	0,036



Absorptionskurven in Chloroform

a) Coffein aus 521 mg entcoffeiniertem Rohkaffee, chromatographisch gereinigt und gelöst in 50 ml Chloroform
b) Reines Coffein (0,65 mg in 100 ml Chloroform)

a) *Absorptionskurven*

Der Beweis, daß das chromatographisch gereinigte Coffein nicht genügend rein ist, liefert die UV-Absorptionskurve in Chloroform. Die Absorptionskurve des chromatographisch gereinigten Coffein-Auszuges aus entcoffeiniertem Rohkaffee in Figur 5 ist gegenüber der Absorptionskurve des reinen Coffeins stark überhöht. Dies erkennt man besonders deutlich im Absorptionsminimum, sowie im langwelligen UV, oberhalb 300 mμ wo reines Coffein nicht mehr meßbar absorbiert. Wesentlich bessere Resultate werden erzielt, wenn man den Abdampfrückstand nach der chromatographischen Reinigung in Wasser löst. Das Coffein geht in Lösung, die störenden lipoidartigen Verunreinigungen bleiben als unlösliche, fettartige Schicht oder als Ring an der Kolbenwand haften. Die wässerigen Coffein-Lösungen erwiesen sich in den meisten Fällen als spektrophotometrisch rein.

b) *Untersuchung der wasserlöslichen Rückstände*

Nach der chromatographischen Reinigung hinterbleibt nach dem Abdestillieren des Chloroforms, wie erwähnt, rein weißes Coffein, das noch mit etwas lipoidartigen Stoffen verunreinigt ist. In kaltem Wasser oder in verdünnter Schwefelsäure löst sich die Hauptmenge des Coffeins glatt auf. In vielen Fällen blieb jedoch ein beträchtlicher Anteil des Coffeins hartnäckig im Rückstand mit den lipoidartigen Verunreinigungen zurück. Dies läßt sich einerseits an den etwas zu niedrigen Resultaten (besonders deutlich bei entcoffeiniertem Kaffee bemerkbar), anderseits am Absorptionsspektrum der lipoidartigen Rückstände erkennen.

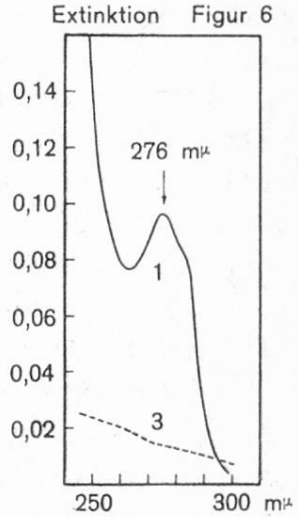
Zur weiteren Untersuchung dieser lipoidartigen Stoffe haben wir nach dem Herauslösen des Coffeins das Kölbchen vorerst gut mit Wasser nachgespült und getrocknet. Den Lipoidrückstand lösten wir in wenigen ml Chloroform. Die Ab-

sorptionskurven zeigen ein charakteristisches Bild. Sehr oft war eine gut ausgeprägte Bande mit einem Maximum bei 276 mμ vorhanden, die nur von Coffein herrühren kann (siehe Figur 6, Kurve 1).

UV-Absorptionskurven der wasserlöslichen Lipoid-Rückstände

Lipoide aus 500 mg Kaffee, gelöst in 50 ml Chloroform

1. Lipoidrückstand mit Coffein-Lipoid-Additionsverbindung (Abdampfrückstand nach der chromatographischen Reinigung auf 105 ° C erhitzt). Diese Absorptionskurve entspricht dem Fleck 1 im Chromatogramm der Figur 7.
3. Lipoid-Rückstand ohne Coffein-Additions-Verbindung (nicht erhitzt) entspricht dem Fleck 3 im Chromatogramm der Figur 7.



Versuchsbedingungen

Je 500 mg entcoffeinierter Kaffee wurden mit Schwefelsäure aufgeschlossen, das Coffein mit Chloroform perforiert und chromatographisch gereinigt. Nach dem Abdestillieren des Chloroforms wurde der Rückstand mit dem Coffein und den Lipoid-Spuren im Versuch 1 einige Minuten im Trockenschrank bei 103—105 ° C getrocknet. Bei Versuch 3 ist nicht erhitzt worden. Das Coffein wurde mit verdünnter Schwefelsäure gelöst, die Kölbchen mit den Lipoid-Rückständen mit Wasser ausgespült und getrocknet. Die Lipoid-Rückstände haben wir in 10 ml Chloroform gelöst und die UV- Absorptionskurven aufgenommen. In der Figur 6 sind alle Extinktionen auf ein Volumen von 50 ml Chloroform umgerechnet, damit sie mit den Extinktionen der Coffein-Bestimmung (50 ml Wasser) vergleichbar sind.

Wir vermuteten zuerst, daß es sich dabei um freies Coffein handle, das aus irgendwelchen Gründen (beispielsweise wegen Umhüllung mit Fettstoffen) vom Wasser nicht aus dem Rückstand herausgelöst worden war. Wir haben daher die Lipoid-Rückstände dünnschichtchromatographisch geprüft. Die aus 0,5 g Kaffee stammenden wasserunlöslichen Lipoid-Rückstände wurden in wenig Chloroform gelöst und möglichst vollständig auf Platten mit fluoreszierendem Kieselgel GF 254 nach *Stahl* aufgetragen. Als Fließmittel diente ein Gemisch Aceton-Methanol 1 + 1. Die Laufzeit betrug 30 Minuten.

Unter der UV-Lampe erkennt man auf den Dünnschichtchromatogrammen die Alkaloide als dunkle, nicht fluoreszierende Flecken (siehe Figur 7). Reines Coffein hat einen Rf · 100-Wert von 60. In den geprüften Lipoid-Rückständen ließ sich freies Coffein nicht nachweisen. Ein auffallender dunkler Fleck mit Rf · 100 = 77—78 war jedoch in all jenen Lipoidrückständen erkennbar, die im UV-Absorptionsspektrum die charakteristische Coffein-Bande zeigten. Hieraus muß geschlossen werden, daß das Coffein von den Lipoiden nicht bloß umhüllt oder eingeschlossen wird, sondern eine chemische Bindung eingeht, die wir vorläufig als Coffein-Lipoid-Additionsverbindung bezeichnen. Im Dünnschichtchromatogramm wandert diese Additionsverbindung weiter als freies Coffein.

Wir versuchten, diese Additionsverbindung hydrolytisch zu spalten. Einstündiges Kochen mit verdünnter Schwefelsäure (0,01—1%ig) oder Erhitzen auf dem Wasserbad blieben erfolglos. Das Coffein wurde nicht abgespalten.

Die in den Lipoidrückständen gebundenen Coffein-Mengen variierten übrigens stark. Gelegentlich waren nach dem Lösen des Coffeins im wasserlöslichen Lipoidrückstand nur noch Spuren oder überhaupt kein Coffein mehr nachweisbar. Die Bildung der Coffein-Lipoid-Additionsverbindung mußte also von Zufälligkeiten in der Arbeitsweise abhängen, die uns vorerst noch unbekannt waren.

Durch systematische Versuche konnte gezeigt werden, daß die Coffein-Verluste hauptsächlich dann eintreten, wenn das Roh-Coffein oder auch das chromatographisch gereinigte Coffein nach dem Abdestillieren des Chloroforms auf dem Wasserbad oder im Trockenschrank längere Zeit erhitzt wird. (Vgl. Figur 7 mit den Dünnschichtschromatogrammen). Ein Teil des Coffeins wird dabei wasserunlöslich und bildet die chloroformlösliche Coffein-Lipoid-Verbindung, wodurch die erwähnten Verluste entstehen. Auf Coffeinverluste beim Abdampfen von Coffein-Chloroform-Lösungen bis zur Trockne hat bereits *Smith* (20) hingewiesen. Er hat vermutet, daß sich dabei etwas Coffein verflüchtigt («des pertes de caféine par volatilisation».) Zweifellos handelt es sich hier ebenfalls um chemische Nebenreaktionen. In der Tabelle 9 sind einige Erhitzungsversuche mit reinem Coffein, das nach dem Schwefelsäure-Aufschluß aus entcoffeiniertem Kaffee isoliert worden war, zusammengestellt. Nach 20—30 Minuten langem Erhitzen von reinem Coffein im Trockenschrank bei 103—105 ° C, waren merkliche Verluste (6—8 %) zu beobachten. Viel größer sind die Verluste bei dem aus Kaffee isolierten, noch ziemlich stark verunreinigten Coffein. Es wurden aliquote Teile des Chloroform-Extraktes eingedampft und die Rückstände im Trockenschrank erhitzt. Nach 5 Minuten langem Erhitzen betrug der Verlust bereits 26,8 %, nach 30 Minuten 76,9 %. Im chromatographisch gereinigten Chloroform-Extrakt sind die Verluste etwas geringer. Diese Coffein-Verluste infolge einer Nebenreaktion beim trockenen Erwärmen sind eigentlich recht erstaunlich, wenn man bedenkt, daß beim Schwefelsäure-Aufschluß während längerer Zeit ($^1/_2$ Stunde) auf Temperaturen bis 200 ° C erhitzt wird und dabei keine Coffein-Verluste auftreten.

Die Coffein-Verluste können vermieden werden, wenn man das Chloroform auf dem Wasserbad nicht vollständig abdestilliert, sondern die letzten Reste bei Zimmertemperatur verdunsten läßt.

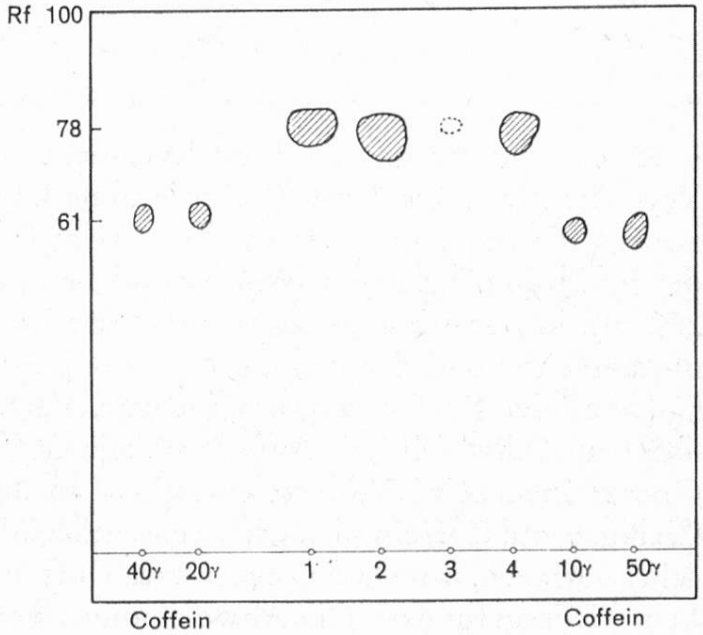
Nach dem Ausblasen der Chloroform-Dämpfe erhält man einen Rückstand, der das gesamte Coffein unzersetzt enthält. In kaltem Wasser löst sich dieses glatt und vollständig auf. Ein Zusatz von Schwefelsäure oder ein Erwärmen der Lösung ist nicht erforderlich. Die Lipoide bleiben an der Kolbenwand haften. Dieser Lipoidrückstand enthält weder freies Coffein noch die Coffein-Lipoid-Additionsverbindung (siehe Figur 7, Fleck 3). In Chloroform gelöst, zeigt der wasserunlösliche Rückstand im UV eine schwache Absorption, aber keine Coffein-Bande. Diese Absorption (Figur 6, Kurve 3, oder «Untergrund» der Lipoide verursacht die stets etwas zu hohen Coffein-Gehalte, wenn man die UV-spektrophotometrische Bestimmung in Chloroform-Lösung, statt in wässeriger Lösung ausführt (vgl. Abschnitt 6a).

Tabelle 9

Coffein-Verluste beim trockenen Erhitzen (105 ° C) von reinem Coffein sowie von Chloroform-Auszügen aus Kaffee

Erhitzungszeit Minuten	Coffein rein				Chloroformauszug von entcoffeinertem Rohkaffee			
	Serie I		Serie II		Vor chromatographischer Reinigung		Nach chromatographischer Reinigung	
	Coffein mg	Verlust %	Coffein mg	Verlust %	Coffein mg	Verlust %	Coffein mg	Verlust %
0	0,208	0	0,370	0	0,164	0	0,174	0
5	0,208	0	0,360	2,7	0,120	26,8	0,168	3,4
10	0,208	0	—	—	—	—	—	—
20	0,195	6,3	—	—	—	—	—	—
30	0,190	8,7	0,342	7,6	0,038	76,9	0,083	52,2

Figur 7



Dünnschichtchromatogramme von Lipoid-Rückständen und Vergleichsflecken mit reinem Coffein

1., 2., 4. Der Abdampf-Rückstand nach der chromatographischen Reinigung (Coffein + Lipoide) wurde im Trockenschrank erhitzt, dann das Coffein mit Wasser herausgelöst. Der wasserunlösliche Rückstand, gelöst in Chloroform, wurde aufgetragen und chromatographiert.
3. Abdampf-Rückstand nicht erhitzt.

7. Modellversuche

Um die Zuverlässigkeit der neuen Methode zu überprüfen, haben wir zahlreiche Modellversuche angestellt. Als Modellsubstanz benützten wir Mischungen aus fein gemahlenem Kaffeezusatz (vorwiegend Cichorie) und genau bekannten Mengen Coffein. In 50 ml Bechergläser wurde die erforderliche Coffein-Menge abgewogen oder in Form einer verdünnten Coffein-Lösung (1,0 mg bzw. 0,1 mg) abpipettiert und das Wasser bei Zimmertemperatur verdunsten gelassen. Anschließend wurde die abgewogene Menge Cichorie zugegeben, dann mit konzen-

trierter Schwefelsäure aufgeschlossen und weiter verfahren, wie in der am Schluß dieser Arbeit angegebenen Methode beschrieben. Beim Schwefelsäure-Aufschluß verhält sich der Kaffeezusatz (Cichorie) ganz ähnlich wie Kaffee. Die Substanz wird teilweise oxydiert und verkohlt weitgehend.

Tabelle 10 Modellversuche mit Cichorie und Coffein

Nr.	Modell-Mischung			Coffein gefunden mg	Ausbeute %
	% Coffein	Cichorie mg	Coffein mg		
1	0	500	0	0,020	—
2	0	500	0	0,019	—
3	0	500	0	0,019	—
4	100	0	0,784	0,780	99,5
5	0,04	500	0,20	0,21	105,0
6	0,16	500	0,80	0,796	99,5
7	0,8	500	4,02	4,04	100,5
8	1,39	487	6,80	6,80	100,0
9	1,40	500	7,00	6,95	99,3
10	1,42	610	8,66	8,59	99,2
11	2,95	500	14,75	14,61	99,1

Die Resultate unserer Modellversuche sind in der Tabelle 10 aufgeführt. Die Versuche Nr. 1 bis 3 mit Cichorie ohne Coffein zeigen, daß bei unserer Methode aus der Cichorie nur Spuren von Verunreinigungen, die Coffein vortäuschen, in die Endlösung gelangen. Auf Grund eines schwach angedeuteten Maximums bei 272 mμ in der Absorptionskurve dieser Extrakte aus Cichorie lag sogar die Vermutung nahe, daß der von uns benützte Kaffee-Zusatz des Handels mit Spuren von Coffein oder Kaffee verunreinigt war. Versuch Nr. 4 mit reinem Coffein beweist, daß beim Schwefelsäure-Aufschluß kein Coffein zerstört und bei den anschließenden Operationen keine Verluste entstehen. In den Versuchen Nr. 5 bis 11, in welchen Cichorie und Coffein in stark wechselnden Mengenverhältnissen (0,04—2,95 % Coffein) vorlagen, wurde das zugesetzte Coffein quantitativ und mit großer Genauigkeit wiedergefunden. Die Abweichungen vom theoretischen Wert liegen normalerweise unter 1 % relativ. Aus den Versuchen Nr. 6—11 berechnet sich eine mittlere Coffein-Ausbeute zu 99,6 % der Theorie. Die Standard-Abweichung beträgt ± 0,5. Bei extrem niedrigen Coffein-Gehalten (unter 0,1 %), wie dies in entcoffeiniertem Kaffee der Fall ist (Modellversuch Nr. 5), sind die Abweichungen größer. Der relative Fehler beträgt ca. 5 %.

8. Coffeinbestimmungen in Kaffee und Kaffee-Extrakten des Handels

Wir haben nach unserer neuen Methode den Coffein-Gehalt in Roh- und Röstkaffee, in Kaffee-Extrakten sowie in einigen entcoffeinierten Produkten bestimmt.

Tabelle 11 Coffein-Bestimmungen in Handelsprodukten

Untersuchungsmaterial	Einzelbestimmungen x_i %			Anzahl Analysen N	Mittelwert $\bar{x}$ %	Standard-Abweichung s ±	Wiederhol-streubereich (P = 95 %) t · s	Relativer Streubereich $V = \frac{t \cdot s \cdot 100}{\bar{x}}$ %
Rohkaffee, coffeinhaltig	2,56	2,54	2,55	6	2,553	0,008	0,021	0,8
	2,56	2,56	2,54					
Röstkaffee, coffeinhaltig	1,16	1,17	1,16	7	1,17	0,009	0,023	2,0
	1,17	1,18	1,18					
	1,16							
Kaffee-Extrakt, coffeinhaltig	4,15	4,12	4,13	7	4,13	0,011	0,026	0,6
	4,13	4,13	4,14					
	4,12							
Entcoffeinierter Rohkaffee	0,033	0,035	0,035	12	0,0342	0,0011	0,0025	7,3
	0,035	0,035	0,033					
	0,035	0,035	0,033					
	0,035	0,034	0,032					
Entcoffeinierter Röstkaffee	0,035	0,034	0,034	11	0,0341	0,0009	0,0021	6,1
	0,035	0,033	0,033					
	0,036	0,034	0,034					
	0,034	0,033						
Entcoffeinierter Kaffee-Extrakt	0,129	0,131	0,127	7	0,127	0,0033	0,0079	6,2
	0,129	0,125	0,121					
	0,129							

Die Resultate sind in der Tabelle 11 zusammengestellt. Aus den Einzelbestimmungen, die zeitlich oft mehrere Wochen auseinander lagen und von verschiedenen Analytikern stammten, sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Streubereiche nach den Angaben von *Dörffel* (21) berechnet worden. Die Reproduzierbarkeit der Resultate ist fast durchwegs sehr gut. Bei den coffeinhaltigen Produkten schwankt die Standardabweichung zwischen 0,008 und 0,011. Der Wiederholstreubereich für die statistische Sicherheit P = 95 % beträgt 0,021—0,026. In relativen Zahlen, d. h. in % des Mittelwertes schwankt der Streubereich zwischen 0,6 und 2 %, was als sehr gut zu bezeichnen ist. Berechnet man die Standardabweichung aus den 20 Einzelbestimmungen der 3 coffeinhaltigen Produkte, so ergeben sich eher etwas günstigere Resultate (Standardabweichung s = 0,0096; Streubereich = 0,020). Für die entcoffeinierten Produkte errechnen sich Standardabweichungen und Streubereiche, die um eine Zehnerpotenz kleiner sind. In relativen Zahlen, d. h. in % des Mittelwertes ausgedrückt, ist der Streubereich als Folge der sehr geringen Coffein-Gehalte wesentlich höher. Für die statistische Sicherheit P = 95 % beträgt der Streubereich für entcoffeinierte Produkte 6,1—7,3 % relativ, was immer noch als gut zu bezeichnen ist, wenn man berücksichtigt, daß zwischen den Resultaten nach anderen Methoden Unterschiede von 100 bis 400 % vorkommen.

Arbeitsvorschrift

Coffein-Bestimmung in Kaffee und Kaffee-Extrakten, UV-spektrophotometrisch (für coffeinhaltige und entcoffeinierte Produkte anwendbar).

Prinzip

1. Das Untersuchungsmaterial wird zunächst mit konzentrierter Schwefelsäure bei ca. 200 ° C aufgeschlossen. Dabei wird das Coffein nicht angegriffen, die übrigen organischen Stoffe verkohlen weitgehend. Nach dem Erkalten wird mit Wasser verdünnt, der gesamte Aufschluß samt Kohle in einen Perforator gespült und das Coffein mit Chloroform perforiert. Der Chloroform-Extrakt wird zur Reinigung durch eine basische Aluminiumoxidsäule filtriert. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wird das Coffein in Wasser gelöst und spektrophotometrisch bestimmt.

Reagenzien

2. a) *Schwefelsäure* konzentriert 95—97%ig;

b) *Coffein-Eichlösung*, enthaltend 0,400 mg reines, wasserfreies Coffein in 100 ml Wasser;

c) *Chloroform*, rein;

d) *Aluminiumoxid* basisch. Aluminiumoxid nach *Brockmann* wird in einem Becherglas mit 1%iger Natriumkarbonatlösung übergossen und gut umgerührt. Anschließend wird auf einer Nutsche abfiltriert, ohne mit Wasser nachzuwaschen. Das Aluminiumoxid trocknet man an der Luft oder im Trockenschrank und glüht es hierauf in einer Platinschale bei 600—700 ° C. Es wird in einer Glasschliff-Flasche vor Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt.

e) *Natronlauge* ca. 10%ig.

Apparatur

3. a) *Luftbad* (siehe Figur 8). Eine Konservendose von ca. 8,5 cm Durchmesser und 11 cm Höhe mit durchlöchertem Boden wird zur Isolation mit Asbestpapier umwickelt. Oben wird sie mit einer Asbestplatte zugedeckt, die 2 kreisrunde Bohrungen hat. In die große Öffnung paßt ein 50 ml-Becherglas, in die kleinere wird ein Thermometer gesteckt. Geheizt wird mit einer Bunsenflamme.

Als Luftbad kann auch ein regulierbarer Infrarotstrahler (Fa. Büchi, Flawil) benützt werden, den man mit einer passenden Asbestplatte bedeckt.

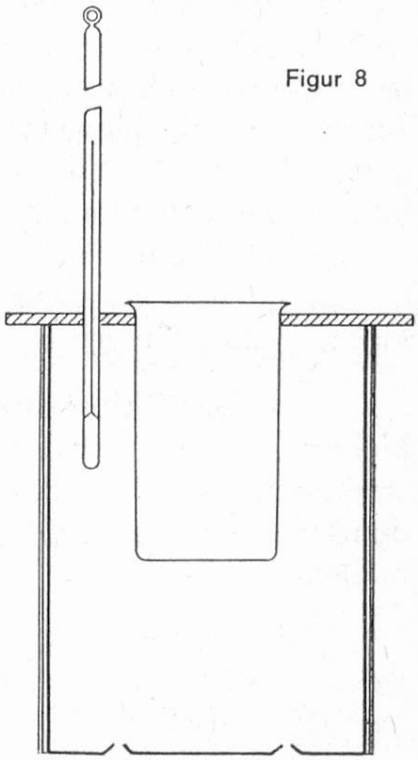
b) *Perforator* nach *Pritzker* und *Jungkunz* (19).

Ausführung der Bestimmung

4. a) *Schwefelsäure-Aufschluß.* Die Einwaage richtet sich nach dem Coffein-Gehalt des Untersuchungsmaterials. Sie beträgt bei:

Roh- und Röstkaffee, nicht entcoffeiniert	0,2 g
Roh- und Röstkaffee, entcoffeiniert	0,5 g
Kaffee-Extrakt, coffeinhaltig	0,1 g
Kaffee-Extrakt, entcoffeiniert	0,2—0,3 g

Figur 8



Luftbad für den Schwefelsäure-Aufschluß

Das fein gemahlene Untersuchungsmaterial wird auf der Analysenwaage in ein 50 ml-Becherglas abgewogen und mit dem doppelten Volumen konzentrierter Schwefelsäure versetzt (mittels Stabpipette gibt man für je 0,1 g Einwaage 0,2 ml Schwefelsäure zu). Mit einem flach gedrückten Glasstab wird das Gemisch gut homogenisiert und anschließend auf dem Luftbad erhitzt. Hierbei schiebt man das Becherglas bis zum Rand durch den kreisrunden Ausschnitt in der Asbestplatte, so daß es in das Luftbad hineinragt. Die Wärmezufuhr ist so zu regulieren, daß die Temperatur 180 bis 200 ° C beträgt. Man läßt das Aufschluß-Gemisch während 10—15 Minuten bei dieser Temperatur stehen, wobei die Masse vollständig verkohlt. Nun fügt man weitere 2 ml konzentrierter Schwefelsäure zu, rührt um und erhitzt noch während 10 Minuten weiter.

Nach dem Erkalten wird zunächst die Kohle mit dem flach gedrückten Glasstab fein verrieben und hierauf mit insgesamt 10 ml Wasser, das man unter Umrühren in kleinen Portionen zugibt, verdünnt. Man kocht das Gemisch während 1 Minute und kühlt ab.

b) *Perforation.* Einen Perforator nach *Pritzker* und *Jungkunz* beschickt man zunächst mit ca. 50 ml reinem Chloroform. Anschließend führt man die gesamte nach 4a erhaltene Aufschlußflüssigkeit samt Kohle quantitativ in den Perforator über. Das Becherglas wird mehrmals mit wenig Wasser gewaschen und evtl. an der Glaswand haftende Kohle mittels Gummiwischer entfernt. Die wässerige Schicht soll ca. 50 ml betragen. Man gibt nun (bei geöffnetem Hahn) noch so viel Chloroform in den Perforator, bis das Kölbchen zu etwa $^1/_3$ mit Chloroform gefüllt ist. Nachdem der Einhängekühler aufgesetzt ist, wird das Kölbchen auf einem Luftbad oder Infrarotstrahler erhitzt bis das Chloroform siedet und in sehr rascher Tropfenfolge vom Kühler tropft. Die wässerige schicht im Perforator mit der Kohle wird stündlich einmal mittels Glasstab oder durch rotierende Bewegungen des ganzen Perforators aufgewirbelt. Die Perforation dauert 4—5 Stunden. Das Kölbchen wird abgenommen und das Chloroform vorsichtig auf einem Wasserbad bis auf 10—20 ml abdestilliert. Es soll auf keinen Fall bis zur Trockne abdestilliert werden.

c) *Chromatographische Reinigung.* Die kombinierte Aluminiumoxid-Säule wird wie folgt beschickt: in ein unten verjüngtes und mit Wattebausch verschlossenes Glasrohr von ca. 12 mm Durchmesser und ca. 20 cm Länge bringt man 4 g basisches Aluminiumoxid (siehe unter 2d) und klopft die Säule, bis die Füllung schön gleichmäßig ist. Die Säule wird nun 2mal nacheinander mit je 10 ml Chloroform ausgewaschen und das unten ausfließende Chloroform samt evtl. vorhandenen Verunreinigungen verworfen. Auf die oberste Zone der Säule gibt man mittels Pipette 0,7 ml 10%ige Natronlauge. Den nach 2 b erhaltenen, auf 10—20 ml eingeengten Chloroformauszug gießt man auf die Säule und saugt ganz schwach ab. Kölbchen und Säule werden portionenweise mit insgesamt 30 ml Chloroform nachgewaschen und das Eluat in einem tadellos gereinigten und trockenen Schliffkölbchen aufgefangen.

Das Chloroform wird nun vorsichtig auf dem Wasserbad bis auf einen kleinen Rest (ca. 1 ml) abdestilliert. Unter dem Abzug läßt man, ohne weiter zu erwärmen, den Rest des Chloroforms aus dem schräg gestellten Kölbchen verdunsten. Die letzten Spuren Chloroform verteibt man durch vorsichtiges Ausblasen.

d) *Spektrophotometrische Messung.* Zum Abdampfrückstand, der rein weißes Coffein und geringe Mengen lipoidartiger Verunreinigungen enthält, pipettiert man 50 ml Wasser. Man schwenkt gut um, damit die Glaswand überall benetzt wird und das Coffein in Lösung geht.

Bei allen entcoffeinierten Produkten wird direkt diese wässerige Lösung spektrophotometrisch ausgemessen. Bei den nicht entcoffeinierten Produkten muß die Lösung auf das 20fache verdünnt werden. Man pipettiert 5 ml in ein 10-ml Meßkölbchen und füllt mit Wasser bis zur Marke auf.

Die Extinktion obiger Coffein-Lösung wird in 1 cm Quarzküvetten gegen Wasser in einem UV-Spektralphotometer bei 272 mμ gemessen. Zur Kontrolle,

ob die Coffeinlösung spektroskopisch rein ist, mißt man noch die Extinktion bei 300 mμ. Diese Extinktion ist gering, sie darf höchstens 10 % der bei 272 mμ gemessenen Extinktion betragen.

Für chemisch reines Coffein beträgt der Quotient $Q = \frac{E_{300}}{E_{272}} \cdot 100 = 2\ \%$.

Eine Kontrollmessung mit der Coffein-Eichlösung (0,400 mg Coffein in 100 ml Wasser) soll, bei 272 mμ gegen destilliertes Wasser gemessen, die Extinktion 0,200 zeigen.

Berechnung

5. Eine Extinktion von 1,00 bei 1 cm Schichtdicke enspricht einer Konzentration von 2,00 mg Coffein in 100 ml. Die abgelesene Extinktion, multipliziert mit 2 gibt die Coffein-Menge in 100 ml Endlösung. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Einwaage berechnet man den Coffein-Gehalt des Ausgangsmaterials. Es gilt folgende Formel:

$$\text{Coffein in } \% = \frac{2 \cdot E \cdot V}{a} \quad \text{wobei}$$

a = Einwaage in mg;
E = abgelesene Extinktion (1 cm Küvette; 272 mμ);
V = Volumen der Endverdünnung.

Bei entcoffeiniertem Kaffee ist V = 50 ml; bei nicht entcoffeiniertem Kaffee dagegen beträgt das Endvolumen (wegen der nochmaligen Verdünnung 1 : 20) V = 1000 ml.

Analysenbeispiele

6. In der Tabelle 12 sind Analysenbeispiele aus der Praxis für 3 verschiedene Produkte aufgeführt. Aus den angegebenen Zahlen über Einwaage, Verdünnung und den gemessenen Extinktionen lassen sich die Resultate nachrechnen.

Zusammenfassung

1. Es wurde eine neue UV-spektrophotometrische Methode zur Bestimmung des Coffein-Gehaltes in Kaffee ausgearbeitet. Die Methode ist anwendbar auf gewöhnlichen und entcoffeinierten Roh- und Röstkaffee, sowie auf Kaffee-Extrakte.

2. Das Untersuchungsmaterial wird zunächst mit konzentrierter Schwefelsäure aufgeschlossen und das Coffein durch Perforation mit Chloroform entzogen. Die weitere Reinigung des Chloroform-Extraktes erfolgt chromatographisch an einer Säule mit basischem Aluminiumoxid. Das gereinigte Coffein wird nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels in Wasser gelöst und UV-spektrophotometrisch bestimmt.

3. Jede einzelne Phase der Methode wurde überprüft und ihre Zuverlässigkeit durch zahlreiche Modellversuche bewiesen. An verschiedenen Kaffeesorten und Kaffee-Extrakten des Handels wurde die neue Methode ausprobiert. Es werden statistische Angaben über Reproduzierbarkeit und Genauigkeit gemacht.

Tabelle 12 Analysenbeispiele

	Rohkaffee	Entcoffeinierter Röstkaffee	Kaffee-Extrakt
Einwaage	0,2042 g	0,5070 g	0,1011 g
Schwefelsäuremenge für den Aufschluß	0,4 ml	1,0 ml	0,2 ml
Nach 10 Minuten zugesetzte Menge Schwefelsäure	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Wassermenge zum Lösen des chromatographisch gereinigten Coffeins	50 ml	50 ml	50 ml
Weitere Verdünnung	5 → 100 ml	—	5 → 100 ml
Volumen der Endlösung	1000 ml	50 ml	1000 ml
Gemessene Extinktion bei 272 mμ in 1 cm Küvette	0,260	0,170	0,209
Extinktion bei 300 mμ	0,008	0,015	0,005
Verhältnis $\frac{E_{300}}{E_{272}} \cdot 100$	3,1 %	8,8 %	2,4 %
Coffeingehalt im Ausgangsmaterial	2,55 %	0,0335 %	4,13 %

Résumé

1. Une nouvelle méthode de dosage spectrophotométrique dans l'UV de la caféine dans le café a été mise au point; elle est applicable aux cafés bruts et torréfiés, courants ou décaféinés, aussi bien qu'aux extraits de café, ce qui fut confirmé par de nombreux essais pratiques.

2. Le produit à examiner est traité de l'acide sulfurique concentré, puis la caféine est extraite au chloroforme. Après distillation du chloroforme la caféine est purifiée par passage sur une colonne d'alumine basique, puis dosée, en solution aqueuse, par spectrophotométrie dans l'ultraviolet.

3. Chaque phase de la méthode a été contrôlée par des essais modèles. On a analysé diverses sortes de café et des extraits de café du commerce. On a calculé divers chiffres statistiques (déviation standard, précision et reproductibilité).

Summary

Description of a new procedure for the UV spectrophotometric determination of coffeine in normal and in coffeine-free raw and toasted coffee, as well as in coffee extracts. This method has been applied with success to many commercial products.

Literatur

1. *Lendrich K.* und *Nottbohm E.:* ZUL, **17**, 241 (1909).
2. *Großfeld J.* und *Steinhoff G.:* ZUL **61**, 38 (1931).
3. *Fendler G.* und *Stüber W.:* ZUL **28**, 9 (1914).
4. *Pritzker J.* und *Jungkunz R.:* ZUL **51**, 97 (1926).
5. *Hilger A., Juckenack A.* und *Wimmer K.:* zitiert nach *Großfeld* und *Steinhoff* ZUL, **61**, 45 (1931).
6. *Hadorn H.* und *Jungkunz R.:* Diese Mitt. **40**, 190 (1949).
7. *Bower R. S., Anderson A. D.* und *Titus R. W.:* Analytic. Chem. **22**, 1056 (1950).
8. *Hadorn H.* und *Suter H.:* Diese Mitt. **48**, 63 (1957).
9. *Manelli G.* und *Mancini P.:* J. Ass. off. agric. Chem. **44**, 554 (1961).
10. *Polzella L.:* Laboratorio Comun. Roma 1961, **23**—29, zitiert nach *Albanese* ZUL **120**, 364 (1963).
11. *Levine J.:* Ass. off. agric. Chem. **45**, 254 (1962).
12. *Barbera C. E.:* ZUL **117**, 483 (1962).
13. *Hagedorn P.:* Dtsch. Apotheker-Ztg. **92**, 430 (1952) Referat in Z. f. analyt. Chem. **139**, 315 (1953). Pharmaz. Zentralhalle Deutschland **91**, 284 (1952).
14. *Albanese F.:* ZUL **120**, 364 (1963).
15. *Richter J.:* ZUL **98**, 107 (1954).
16. *Albanese F.:* Dtsch. Lebensm. Rundsch. **59**, 260 (1963).
17. *Cortes F. F.:* Rev. Soc. brasil. Chim. **4**, 105 (1933) Referat in ZUL **74**, 106 (1937).
18. *Vercillo A.:* und *Manzone A. M.:* Ist. Sup. Sanità **25**, 574 (1962) Referat in ZUL. **123**, 259 (1963/64).
19. *Pritzker J.* und *Jungkunz R.:* Pharm. Acta Helv. **11/12**, 223 (1939). Diese Mitt. **30**, 262 (1939) verbessertes Modell s. diese Mitt. **42**, 232 (1951) und diese Mitt. **44**, 229 (1953).
20. *Smith R. F.:* Premier Colloque int. sur la chimie des cafés, Inst. français du café et du cacao, Paris, p. 55 (1963); repris de Café, thé. Vol. VII, No 3 et 4 (1963).
21. *Doerffel K.*: Beurteilung von Analysenverfahren und -Ergebnissen, Springer-Verlag, Berlin (J. F. Bergmann, München), erschienen in Z. analyt. Chem. **185**, 1—98 (1962).
22. *Kresze G.:* Physikalische Methoden in der organischen Chemie, Sammlung Göschen, Bd. 45/45a, 93 (1962).