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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 67 (1976)

Heft: 2

Artikel: Neue Erkenntnisse zur quantitativen Bestimmung der Carbonsäure-5-hydroxy-tryptamide in Kaffee

Autor: Kummer, P. / Bürgin, E.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982960

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: 13.07.2025

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

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **67**, 212—225 (1976)

Neue Erkenntnisse zur quantitativen Bestimmung der Carbonsäure-5-hydroxy-tryptamide in Kaffee*

P. Kummer und *E. Bürgin*
Laboratorium der Coffex AG, Schaffhausen

Einleitung

Im Laufe der letzten Jahre sind diverse als «mild» oder «reizarm» angepriesene Kaffees auf den Markt gekommen. Zur Beurteilung dieser Kaffees sind die in den äußeren Wachsschichten der Kaffeebohne vertretenen Carbonsäure-5-hydroxy-tryptamide (C-5-HT) herangezogen worden. Als Bewertungsgrundlage dient die dünnschichtchromatographisch einheitliche «Substanz I». Es sind dies drei in den Fettsäureresten verschiedene Tryptamide, die den Hauptanteil an C-5-HT ausmachen. Die Zusammensetzung des Gemisches ist annähernd konstant (3, 4):

48 % Arachinsäure-5-hydroxy-tryptamid
48 % Behensäure-5-hydroxy-tryptamid
4 % Lignocerinsäure-5-hydroxy-tryptamid.

Vom Eidg. Gesundheitsamt (EGA) wurden im Kreisschreiben Nr. 2 vom 8. Januar 1973 die Bedingungen für die Bezeichnung «reizarm» für Kaffee wie folgt festgelegt: C-5-HT-Gehalt: Maximal 400 ppm. Außerdem muß die bessere Bekömmlichkeit durch klinische Tests nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der C-5-HT

J. Wurziger und *U. Harms* sowie *J. Wurziger* und *G. Kurz* beschrieben 1969 bzw. 1971 eine quantitative Bestimmung der «Substanz I» (1, 2). Das EGA legte in seinem Kreisschreiben von 1973 ebenfalls eine Vorschrift fest: «Bestimmung der Carbonsäure-5-hydroxy-triptamide in Roh- und Röstkaffee». Diese Vorschrift stützt sich auf eine Vorlage der Firma Kaffee Hag, Bremen. Diese Firma überarbeitete ihre Methode und brachte im März 1972 eine neue, verbesserte Arbeitsvorschrift heraus.

* Vortrag gehalten am 6. September 1975 anläßlich der 87. Jahresversammlung der Schweiz. Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie.

Prinzip der Methoden

Dieses ist für alle erwähnten Methoden praktisch gleich: Die in der Wachsauflagerung von Kaffeebohnen befindlichen C-5-HT werden durch Extraktion mit einem geeigneten Lösungsmittel herausgelöst und durch Säulenchromatographie von störenden Begleitsubstanzen befreit. Die so verarbeitete Lösung wird im Zentrum einer Dünnschichtplatte aufgetragen und die oben erwähnte «Substanz I» mittels Zirkulartechnik abgetrennt. Der Nachweis der C-5-HT erfolgt durch Besprühen mit Gibbs-Reagens (2,6-Dichlorchinonchlorimid), wobei sich blaue Indophenol-Farbstoffe bilden, die als konzentrische Ringe hervortreten. Der äußere blaue Ring, der zugleich die Hauptkomponenten der C-5-HT (Substanz I) enthält, wird abgeschabt und zur vollständigen Umsetzung mit weiterem Gibbs-Reagens verrührt. Nach Auswaschen des Reagensüberschusses wird der blaue Farbstoff mit Benzylalkohol eluiert und der Gehalt der Lösung an C-5-HT spektralphotometrisch bestimmt. Die Berechnung in mg C-5-HT/kg Kaffee erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve.

Diskussion der Methoden

Unterschiede zwischen den erwähnten Methoden bestehen in der Extraktionsart, dem Extraktionslösungsmittel, dem Mahlgrad des Kaffees, der Extraktvorreinigung und dem Laufmittel der Dünnschichtchromatographie.

Im folgenden soll auf die Version nach EGA und auf die neue, verbesserte Version nach Hag, Bremen, kurz näher eingegangen werden.

Vorschrift des EGA vom 8. Januar 1973:

Es werden ganze Kaffeebohnen mit Methanol 3mal $^1/_2$ Std. bei 35—40°C im Rotationsverdampfer extrahiert. Daß dieses Extraktionslösungsmittel nicht ideal ist, zeigen folgende Versuche mit verschiedenen Lösungsmitteln: Extrahiert wurde Röstkaffee in ganzen Bohnen nach der Vorschrift des EGA, aber mit diversen Lösungsmitteln.

Methanol:	330/380 ppm CHT
Iso-Propanol:	520/520 ppm CHT
Aethanol:	460 ppm CHT
Benzol:	530 ppm CHT
Chloroform/Aethanol 7/3:	580 ppm CHT

Mit Methanol als Extraktionslösungsmittel werden also deutlich weniger C-5-HT herausgelöst.

Die neue Version nach Hag, Bremen, verwendet deshalb das Lösungsmittel Chloroform/Aethanol (7 : 3) und extrahiert bei Zimmertemperatur an einer Schüttelmaschine. Ansonst sind die beiden Methoden bis auf eine Extraktvorreinigungsstufe gleich.

Daß auch die Extraktionstemperatur und die Extraktionsart eine Rolle spielen, zeigen folgende Werte: Lösungsmittel Chloroform/Aethanol (7 : 3), Extraktion

ganzer Kaffeebohnen, Extraktion bei 40°C, am Rotationsverdampfer: 580 ppm CHT.

Extraktion bei Zimmertemperatur, Schüttelmaschine: 480 ppm CHT.

Sehr fein gemahlener Röstkaffee kann mit den genannten Analysenvorschriften kaum analysiert werden, da vor allem das in großen Mengen mitherausgelöste Kaffeeöl eine einwandfreie Dünnschichtchromatographie verhindert. Die oben erwähnten Methoden sind deshalb nur für ganze Kaffeebohnen und beschränkt für sehr grob gemahlenen Kaffee anwendbar. Wie sich herausstellte, ist so eine totale Extraktion der C-5-HT nicht gegeben.

Wie aus diesen Untersuchungen hervorgeht, werden bei den erwähnten Methoden die C-5-HT nicht quantitativ erfaßt. Es ist deshalb notwendig, folgende Faktoren der Analyse genau zu definieren, um reproduzierbare Werte zu erhalten:

Extraktionslösungsmittel, Extraktionstemperatur, Extraktionsart, Mahlgrad des Kaffees.

Fehlergrenzen und Standardabweichungen

Bei der Vorschrift des EGA wird als relativer Fehler ± 10 %, bei Doppelbestimmungen ± 5 % (Mittelwert) angegeben. Bei uns wurden Maximalabweichungen zweier Analysenwerte von über 100 ppm gefunden.

Neue Version Hag, Bremen: Es wurde mit Hag, Bremen, eine Vergleichsanalysenreihe nach Vorschrift Hag durchgeführt, die über die Standardabweichungen Auskunft gibt (Tabelle 1).

Die Tatsache, daß Hag, Bremen, für den von uns grob gemahlenen Kaffee niedrigere Werte an C-5-HT erhalten hat, zeigt, daß die Extraktionsart ganz genau definiert sein muß, um reproduzierbare Resultate zu erhalten. Unterschiedlich starkes Ausschütteln an einer Schüttelmaschine kann zu unterschiedlichen Resultaten führen.

Eichkurven

Eine gewisse Unsicherheit scheint auch bei den Eichkurven der C-5-HT-Analysen zu bestehen. *J. Wurziger* und *U. Harms* (1) ermittelten einen Umrechnungsfaktor von 860, in der Vorschrift des EGA ist 1180 angegeben, und die neue Version nach Hag, Bremen, arbeitet mit dem Faktor 900.

Außerdem ist es bei den oben genannten Methoden notwendig, Mehrfachanalysen durchzuführen, um eine ausreichende Sicherheit der Resultate zu gewährleisten, d. h. um Werte innerhalb der Standardabweichung zu bekommen. Dies ist jedoch infolge des großen Zeitaufwandes der Analyse ein langwierige Angelegenheit und für die routinemäßige Anwendung nicht geeignet.

Es wurde deshalb eine Methode entwickelt, die schon bei Einfachanalysen sichere Werte liefert und außerdem kleinere Standardabweichungen besitzt.

Tabelle 1
Vergleichsanalysen und Standardabweichungen nach Vorschrift Hag, Bremen

	Coffex	Hag
Kaffee A, geröstet		
Anzahl Analysen	6	6
Mittelwert	593 ppm	620 ppm
Standardabweichung	23 ppm	56 ppm
	3,9 %	9,1 %
Kaffee A, geröstet		
grob gemahlen		
Anzahl Analysen	6	6
Mittelwert	580 ppm	460 ppm
Standardabweichung	31 ppm	32 ppm
	5,3 %	7,0 %
Kaffee B, geröstet		
Anzahl Analysen	6	6
Mittelwert	269 ppm	270 ppm
Standardabweichung	27 ppm	19 ppm
	10,1 %	7,0 %
Kaffee B, geröstet		
grob gemahlen		
Anzahl Analysen	6	6
Mittelwert	263 ppm	221 ppm
Standardabweichung	39 ppm	38 ppm
	14,8 %	17,4 %
Maximalabweichung		
zweier Analysenwerte	108 ppm	140 ppm

C-5-HT-Bestimmung im UV-Bereich

Als Grundlage der quantitativen Bestimmung der C-5-HT in Kaffee wurde die Absorption der C-5-HT im Ultraviolettbereich des Lichtes verwendet. Maximum der Absorption bei 278 nm. Durch geeignete Dünnschichtchromatographie an Kieselgelplatten können die C-5-HT von den Begleitsubstanzen abgetrennt und nach Eluation aus dem Kieselgel durch Messung des UV-Spektrums von 250—350 nm quantitativ bestimmt werden. Dabei ist eine graphische Korrektur des Untergrundes zu berücksichtigten. Die Methode kann für Roh- und Röstkaffee, gemahlen und ungemahlen, verwendet werden. Bei gemahlenem Kaffee werden vor der Extraktion der C-5-HT das störende Kaffeeöl und weitere Begleitstoffe mit Petroläther selektiv entfernt. Der Petrolätherextrakt enthält keine C-5-HT.

Analysenvorschrift

Prinzip

Die in der Wachsauflage von Kaffeebohnen befindlichen C-5-HT werden durch Extraktion mit Chloroform/Aethanol (7 : 3) herausgelöst und durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel die «Substanz I» abgetrennt. Der Nachweis erfolgt direkt durch Herauskratzen des Kieselgels mit der «Substanz I» und Eluation derselben mit Aethanol. Die resultierende Lösung wird spektralphotometrisch von 250—350 nm vermessen. Die Bestimmung des Gehaltes an C-5-HT erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve.

Reagenzien

Kieselgel DF5, Camag, für Dünnschichtchromatographie (mit Fluoreszenzindikator)
Chloroform p. a.
Aethanol abs. p. a.
Diäthyläther p. a.
Aluminiumoxid, basisch, Akt. II (Fluka)
Florosil 60—100 mesh (Fluka)
Petroläther Ph. Helv. VI (Siegfried)

Geräte

Dünnschichtplatten 20×20 cm
Dünnschichtplatte mit Zentralbohrung, 20×20 cm
Chromatographiesäule mit Hahn, Länge 30 cm, ⌀ 17 mm
Tropfbüretten mit Hahn
Glasfritten D3, ⌀ 5 cm
Mikrochromatographiesäule

Dünnschichtplatten

50 g Kieselgel DF5 werden mit ca. 110 ml Wasser gemischt. Die Menge reicht für 10 Platten 20×20 cm aus. Die Schichtdicke beträgt 0,30 mm. Die Platten werden ca. $1^1/_2$ Std. an der Luft getrocknet, dann 2 Std. bei 120°C im Trockenschrank aktiviert.

Analyse

a) Extraktherstellung

Ganze Kaffeebohnen:

10 g Kaffee, roh oder geröstet, werden 3mal mit je 75 bis 80 ml Chloroform/Aethanol (7 : 3) 30 min bei 40—45°C am Rotationsverdampfer extrahiert.

Nach der 3. Extraktion werden der Kolben und die Kaffeebohnen mit ca. 50 ml Lösungsmittel nachgespült. Die gesammelten Extrakte werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingeengt und in einem 25-ml-Meßkolben bis zur Marke aufgefüllt.

Gemahlener Kaffee:

10 g Kaffee, fein gemahlen (Korngröße 0,40 mm), werden 3mal mit je 100 ml Petroläther 15 min bei Zimmertemperatur an einer Schüttelmaschine extrahiert. Die Extrakte werden verworfen. Das Kaffee-Petroläther-Gemisch wird jeweils durch eine Glasfritte D3, ⌀ 5 cm, filtriert und der gemahlene Kaffee wieder in den Kolben zurückgebracht.
Anschließend wird der Kaffee gleich weiter extrahiert, wie oben für ganze Kaffeebohnen beschrieben. Die einzelnen Extrakte werden direkt durch eine Säule (⌀ 17 mm), bestehend aus 3 cm hoch Aluminiumoxid, basisch, Akt. II, darüber 3 cm hoch Florisil 60—100 mesh, filtriert.
Nach dem 3. Extrakt wird die Säule mit 50 ml Chloroform/Aethanol (7 : 3) nachgewaschen. Die vereinigten gereinigten Extrakte werden am Rotationsverdampfer eingeengt und auf 25 ml aufgefüllt.

b) Dünnschichtchromatographie

2,5 ml der Extraktlösung werden im Zentrum einer Dünnschichtplatte aufgetragen. In der Mitte der Platte wird zur Begrenzung des Fleckes ein Teflonring, ⌀ 15 mm, aufgestellt. Die aufzutragende Extraktlösung wird durch eine Mikrochromatographiesäule mit 0,3 g Aluminiumoxid, basisch, Akt. II, direkt innerhalb des Teflonringes auf die Dünnschichtplatte gebracht. Die Säule wird mit 3 ml Chloroform/Aethanol (7 : 3) nachgespült. Für den Extrakt aus gemahlenem Kaffee wird die Mikrosäulenchromatographie weggelassen und der Extrakt direkt auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Zur Abdunstung des Lösungsmittels wird mit dem Fön erwärmt.
Obige Dünnschichtplatte wird nun nach der Zirkularmethode entwickelt. Laufmittel: Diäthyläther/Chloroform (9 : 1). Lauflänge 6—8 cm, Laufzeit ca. 45 min.
Nach dem Entwickeln wird die Dünnschichtplatte unter eine UV-Lampe 254 nm gebracht. Auf den Platten mit Fluoreszenzindikator erscheinen die C-5-HT und weitere Substanzen als dunkle Ringe (Fluoreszenzlöschung). Der der «Substanz I» entsprechende Ring wird markiert und anschließend herausgekratzt. Das herausgekratzte Kieselgel wird nun in einem Reagenzglas mit 10 ml absolutem Aethanol in 3 Portionen heiß extrahiert. Die heiße Lösung filtriert man jeweils durch eine Glasfritte D3. Am Schluß wird die erhaltene Lösung mit Aethanol auf 10 ml aufgefüllt.

Messung

Es wird das UV-Spektrum der obigen Lösung von 350 nm bis 250 nm gegen Aethanol aufgenommen.

Berechnung des C-5-HT-Gehaltes

Durch gewisse Verunreinigungen, die im UV ebenfalls absorbieren, wird die Absorptionskurve in vielen Fällen, vor allem bei gemahlenem Kaffee, etwas überhöht. Die direkte Berechnung der C-5-HT-Gehalte aus den gemessenen Extinktionen bei 278 nm liefert daher zu hohe Werte. Die Erhöhung durch den sogenannten Untergrund läßt sich graphisch nach dem von *Kresze* (5) beschriebenen Grundlinienverfahren korrigieren. Durch zwei, dem Absorptionsmaximum benachbarte Punkte, hier das Minimum bei 248 nm und die Absorption bei 330 nm, zieht man eine Gerade (Grundlinie).

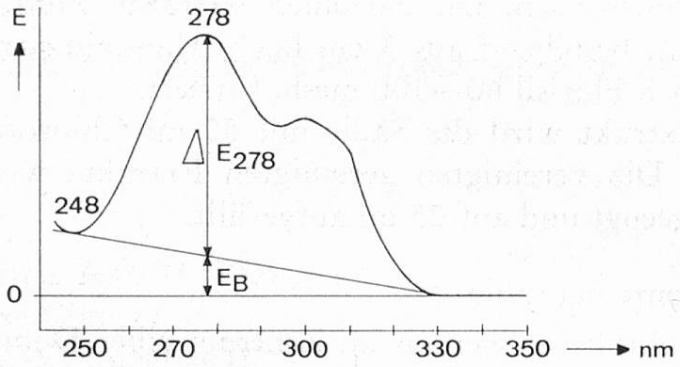

Abb. 1. Graphische Korrektur der Extinktion nach Kresze.

E_B ist der Anteil der Extinktion (im Absorptionsmaximum) bis zur Grundlinie. Durch absorbierende Verunreinigungen wird dieses Stück erhöht. Für die Berechnung des C-5-HT-Gehaltes wird nur der über der Grundlinie liegende Extinktionsanteil, also E_{278}—E_B berücksichtigt. Dieser Anteil ist dem C-5-HT-Gehalt proportional. Einem Extinktionsanteil E_{278}—E_B von 1,00 entspricht aufgrund eigener Eichkurven ein C-5-HT-Gehalt von 1,008 mg in 10 ml Aethanol.

Eine Korrektur dieser Art findet auch bei der Coffeinanalyse nach Levine Anwendung.

Die Auswirkung der Korrektur auf die Analysenresultate zeigt die Tabelle 2.

Daß eine Korrektur notwendig ist, zeigen vor allem die UV-Spektren der C-5-HT aus gemahlenem Kaffee, die eindeutig erhöht sind.

Die Richtigkeit der Korrektur zeigt sich in der Uebereinstimmung der Werte mit einer weiteren Analyse, nämlich einer Analyse via Indophenolfarbstoffe und Direktauswertung ab Dünnschichtplatte (siehe Seite 221—224).

Eichkurve (siehe Abb. 2)

Die Eichkurve wurde aufgestellt mit Hilfe einer Modellsubstanz, dem Serotonin (5-Hydroxy-tryptamin) (Serotonin-hydrogenoxalat, puriss, ⩾ 99%, Fluka AG, Buchs).

Tabelle 2
C-5-HT-Bestimmung in Kaffee. Einfluß der graphischen Korrektur

Kaffee	C-5-HT ppm unkorr.	C-5-HT ppm korr.	Δ C-5-HT ppm
Mischung A	432	410	22
geröstet	427	405	22
ganze Bohnen	417	390	27
	427	400	27
Mischung A	485	425	60
geröstet	500	430	70
gemahlen	500	415	85
	485	425	60
Mischung B	162	135	27
geröstet	167	140	27
ganze Bohnen	170	145	25
	167	145	22
Mischung B	250	195	55
geröstet	233	180	53
gemahlen	230	170	60
	238	180	58

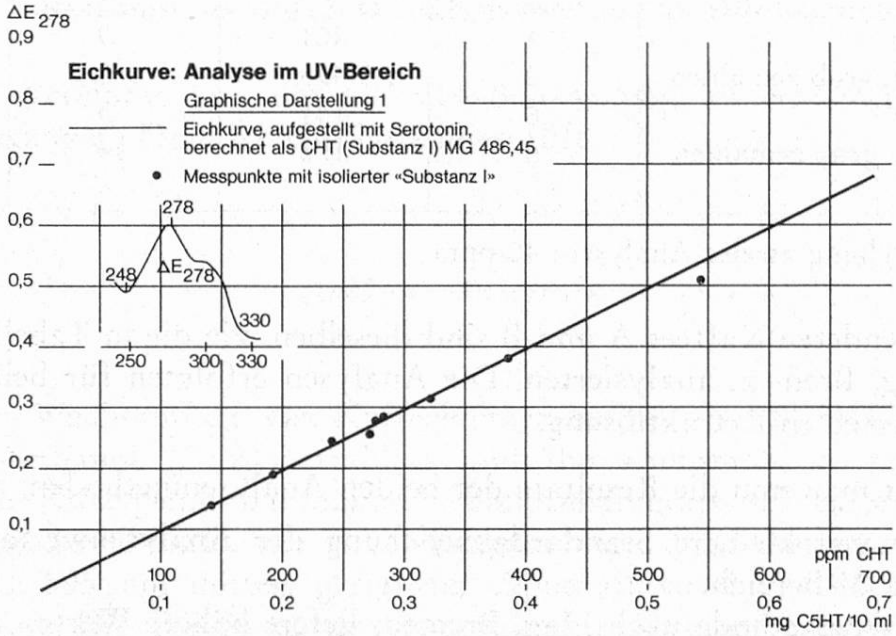

Abb. 2. C-5-HT-Analyse im UV-Bereich. Eichkurve.

Es wurde eine Stammlösung in 94%igem Aethanol hergestellt und von dieser aus Lösungen verschiedener Konzentrationen.

Der Serotoningehalt wurde umgerechnet auf C-5-HT der auf Seite 212 aufgeführten Zusammensetzung («Substanz I»).

Mittleres Molekulargewicht: 486,45

Als Eichkurve wurde aufgetragen:

ppm C-5-HT gegen ΔE_{278}
mg C-5-HT gegen ΔE_{278}

Diese Eichkurve wurde wie folgt überprüft mit durch Säulenchromatographie isolierter «Substanz I» und für richtig befunden.

Säulenchromatographie

Säule: Kieselgel 60, Merck, 70—230 mesh, für Säulenchromatographie.

Eluationsmittel: Diäthyläther.

Chromatographiert wurde eine Extraktlösung aus Rohkaffee (Santos), hergestellt mit Chloroform/Aethanol (7 : 3). Diese wurde zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit Aether ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wurde eingeengt und chromatographiert. Die erhaltene Substanz I wurde aus Diäthyläther umkristallisiert.

Tabelle 3
C-5-HT-Analyse im UV-Bereich. Resultate und Standardabweichungen

Kaffee	Zahl der Analysen	Mittelwert C-5-HT ppm	Standardabweichung	
			C-5-HT ppm	%
A geröstet	4	401	9	2,2
A geröstet, grob gemahlen	6	425	5	1,2
B geröstet	6	141	5	3,5
B geröstet, grob gemahlen	6	178	14	7,9

Maximalabweichung zweier Analysen: 40 ppm

Die verwendeten Kaffees A und B sind dieselben wie die in Tabelle 1 nach der Methode Hag, Bremen, analysierten. Die Analysen erfolgten für beide Methoden aus jeweils derselben Extraktlösung.

Vergleicht man nun die Resultate der beiden Analysenmethoden, erkennt man:

1. Eine sehr viel kleinere Standardabweichung der Analysenwerte der Bestimmung im UV-Bereich.
2. Die Analysenmethode nach Hag, Bremen, liefert höhere Werte.

Durch Dünnschichtchromatographie konnte gezeigt werden, daß bei beiden

Analysenmethoden dieselben C-5-HT («Substanz I») isoliert werden. Der Unterschied der Werte beruht auf nicht übereinstimmenden Eichkurven, wie, unter Berücksichtigung der möglichen Streuungen bei Einzelanalysen, die lineare Abhängigkeit der Analysenwerte zeigt (siehe Abb. 3).
Die andere Möglichkeit ist die, daß die Analysenwerte nach Hag, Bremen, durch einen nicht berücksichtigten Untergrund erhöht werden. Der Untergrund müßte dann linear vom C-5-HT-Gehalt abhängen.

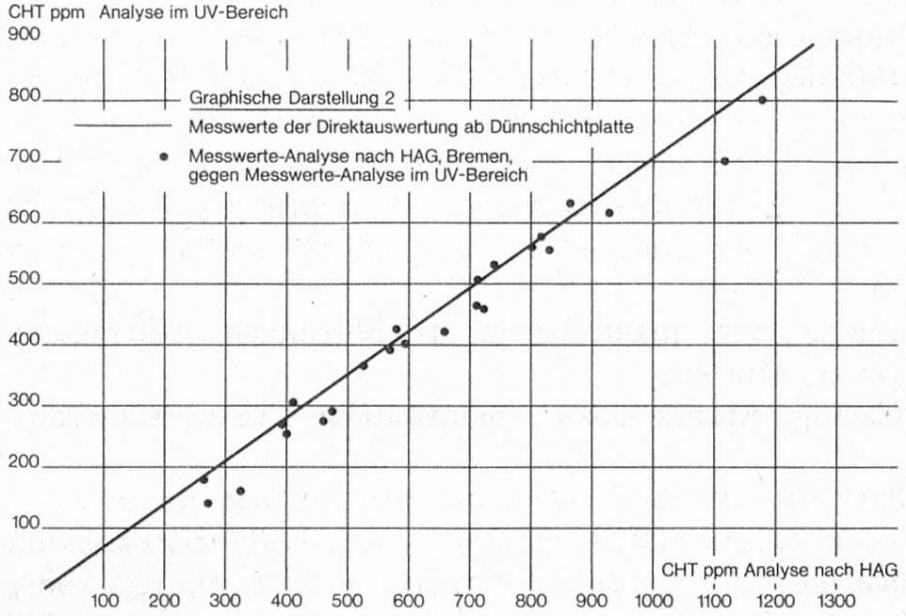

Abb. 3. Abhängigkeit der Analysenwerte verschiedener C-5-HT-Analysenmethoden.

C-5-HT-Bestimmung durch Direktauswertung ab Dünnschichtplatte

Um eine Vereinfachung der C-5-HT-Bestimmung zu erreichen, wurde die Direktauswertung ab Dünnschichtplatte überprüft.

Analysenvorschrift

Prinzip

Die in der Wachsauflage von Kaffeebohnen befindlichen C-5-HT werden mit Chloroform/Aethanol (7 : 3) extrahiert und die «Substanz I» auf mit Soda imprägnierten Kieselgelplatten dünnschichtchromatographisch abgetrennt. Nach dem Anfärben der C-5-HT mit Gibbs-Reagens wird die Absorption bei Wellenlängen größer 595 nm mittels geeigneter Apparaturen direkt ab Dünnschichtplatte bestimmt. Die Fläche unter der erhaltenen Absorptionskurve ist proportional der Substanzmenge im Fleck.

Reagenzien

Kieselgel für Dünnschichtchromatographie
Natriumcarbonat
Petroläther p. a.
Chloroform p. a.
Aethanol abs. p. a.
Diäthyläther p. a.
Aceton p. a.
Gibbs-Reagens (2,6-Dichlorchinon-chlorimid)
Aluminiumoxid, basisch, Akt. II
Florisil 60—100 mesh

Geräte

Glasfritten D3
Strichauftragegerät zur quantitativen strichförmigen Auftragung (Bsp. Linomat II, Camag, Muttenz)
T-Scanner, Camag, Muttenz, zur quantitativen Auswertung ab Dünnschichtplatte

Dünnschichtplatten

Herstellung der Platten analog Beschreibung auf Seite 216. Nur erfolgt die Herstellung mit 0,5 n Natriumcarbonatlösung anstelle von Wasser.

Analyse

a) Extraktherstellung: Analog Abschnitt a) auf Seite 216.
Kaffeemengen: nicht behandelter Kaffee 5 g
behandelter Kaffee 10 g
Einengen der Extrakte auf 100 ml.
Bei Kaffees, die unter ca. 250 ppm C-5-HT enthalten, ist es vorteilhafter, den Extrakt auf 50 ml einzuengen.

b) Dünnschichtchromatographie
50 µl werden strichförmig auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (Linomat II, Camag). Strichlänge 19 mm. Bei Dünnschichtplatten von 20×20 cm ist die Auftragung von 6 Proben möglich. 3 Auftragungen pro Extrakt haben sich als genügend erwiesen, um einen guten Mittelwert zu erhalten.
Entwickelt wird die Platte linear in einem Entwicklungstank. Zur Kammersättigung wird in den Tank ein Stück Fließpapier gestellt.

Laufmittel: Diäthyläther/Aceton (9 : 1).
Laufzeit ca. 30 min, Lauflänge ca. 15 cm.

Bemerkung. Stets frisch angesetztes Laufmittel verwenden. Dünnschichtplatten müssen gleichmäßig beschichtet sein. Bei einer Betrachtung der Platten gegen das Licht dürfen keine verschieden helle Stellen sichtbar sein. Beim T-Scanner von Camag, Muttenz, erfolgt sonst bei diesen Stellen eine Aenderung der Absorption. Dies kann zur Folge haben, daß die Null-Linie der Absorption vor und nach dem Substanzfleck nicht gleich ist. Daraus ergeben sich eine erschwerte Auswertung und eventuell ungenaue Resultate.

Nach der Entwicklung wird die Dünnschichtplatte mit dem Fön kalt angeblasen, um das restliche Laufmittel total zu entfernen. Wenn der Geruch nach Aceton nicht mehr feststellbar ist, wird die Platte mit einer 0,3%igen Lösung von Gibbs-Reagens in absolutem Aethanol besprüht, bis die C-5-HT («Substanz I») als homogen gefärbter, blauer Fleck hervortreten. Nach einer Wartezeit von ca. 10 min kann die Platte im T-Scanner vermessen werden.

Dabei werden pro Substanzfleck jeweils 2 Messungen gemacht, um Schwankungen auszumitteln.

Auswertung der Kurven und Berechnung der C-5-HT-Gehalte

Die Fläche der erhaltenen Absorptionskurven (mm^2) wurde nach der Formel Höhe mal Halbwertsbreite (Breite der Kurve auf halber Höhe) bestimmt.

Aus Versuchen mit aus Kaffee isolierter «Substanz I» (vgl. Abschnitt Eichkurve auf S. 220) errechnete man einen Umrechnungsfaktor F_{Eich} zur Umrechnung der Fläche in ppm C-5-HT.

Die Umrechnungsfaktoren sind bei konstanten Meßbedingungen des T-Scanners abhängig von

der Strichlänge der Auftragung,

der aufgetragenen Substanzmenge (Konzentration der Extraktlösung) und

von der Schreibbreite des Schreibers, da bei einer Vergrößerung der Schreibbreite die zu einer bestimmten C-5-HT-Konzentration gehörende Fläche ebenfalls zunimmt.

Für jede Meßanordnung oder Aenderung einer dieser Faktoren muß deshalb der Umrechnungsfaktor neu bestimmt werden. Es zeigte sich, daß die Fläche der Absorptionskurve bis zu einer Konzentration der Extraktlösung von 6 mg C-5-HT/100 ml für die oben angegebenen Analysenbedingungen linear von der Substanzmenge C-5-HT abhängig ist. Die Konzentrationen der Extraktlösungen sind so gewählt, daß sie in diesem Bereich liegen.

Resultate, Standardabweichungen, Vergleiche mit übrigen Analysen

Die in der Tabelle 4 unter Direktauswertung angeführten C-5-HT-Werte sind einerseits mit dem aus Versuchen mit isolierter «Substanz I» errechnetem Umrech-

nungsfaktor F_{Eich}, anderseits mit einem Faktor F_{Hag}, der aus Vergleichsversuchen mit der Analysenmethode nach Hag, Bremen, bestimmt wurde, berechnet.

Tabelle 4 Vergleichswerte verschiedener Analysenmethoden

Kaffee geröstet	Gemahlen C-5-HT ppm Analyse				Ungemahlen C-5-HT ppm Analyse			
	Nach Hag	Im UV	Direktauswertung		Nach Hag	Im UV	Direktauswertung	
			F_{Hag}	F_{Eich}			F_{Hag}	F_{Eich}
Tanzania	—	570	868	611	—	490	730	514
Robusta C. J.	—	565	801	564	—	472	673	474
Haiti	927	615	880	620	801	560	823	580
Santos	1179	800	1148	808	1116	700	1007	709
Ecuador	815	575	798	562	711	505	779	548
Columbia	864	630	845	595	738	530	709	500
Mischung, reizarm	—	—	—	—	409	305	437	308
Mischung, reizarm	—	—	—	—	—	160	256	180
Mischung, reizarm	—	—	—	—	—	290	434	305

Es zeigt sich eine gute Uebereinstimmung der Werte der Bestimmung im UV-Bereich und derjenigen der Direktauswertung ab Dünnschichtplatte, wenn man von den mit isolierter «Substanz I» (C-5-HT) aufgestellten Eichkurven ausgeht.

Wiederum ergibt die Methode nach Hag, Bremen, eindeutig höhere Werte. Auch hier zeigt sich wieder, daß die von Hag verwendete Eichkurve nicht richtig sein kann. Mit einem Faktor F_{Hag}, berechnet aus den Flächen der Absorptionskurven und den nach Hag bestimmten C-5-HT-Werten verschiedener Kaffees, ergeben sich auch gute Uebereinstimmungen zwischen der Methode Hag und der Direktauswertung. Dies beweist die lineare Abhängigkeit der Analysenwerte nach Hag und UV und daß die Differenzen von nicht übereinstimmenden Eichkurven herstammen können (vgl. Abb. 3: Die Gerade entspricht den Werten der Direktauswertung).

Die korrekten C-5-HT-Werte erhält man jedoch mit dem Faktor F_{Eich} und mit der Bestimmung im UV-Bereich.

Die Standardabweichungen für die Bestimmung via Direktauswertung ab Dünnschichtplatte bewegen sich zwischen 0,6% und 6%, also in der gleichen Größenordnung wie die Standardabweichungen der Bestimmung im UV-Bereich. Dies gilt sowohl für die Meßwerte innerhalb einer Dünnschichtplatte als auch für Meßwerte auf verschiedenen Platten.

Aus der Tabelle 4 ist auch ersichtlich, daß für gemahlenen Kaffee eindeutig höhere Werte erhalten werden als für ungemahlenen Kaffee. Für die Routineanwendung ist jedoch eine Analyse ganzer Kaffeebohnen bei genau definierten

Bedingungen vorteilhafter infolge der größeren Einfachheit und des kleineren Zeitaufwandes der Analyse.

Zusammenfassung

Es werden zuerst die bekannten C-5-HT-Bestimmungsmethoden diskutiert. Anschließend werden zwei neue Bestimmungsmethoden, nämlich die Analyse im UV-Bereich und die Direktauswertung ab Dünnschichtplatte, beschrieben. Diese beiden Methoden liefern Werte mit um ca. 50% verbesserten Standardabweichungen. Außerdem zeigte es sich, daß die anderen, schon bekannten Methoden höhere Werte liefern.

Résumé

Les méthodes d'analyses connues des C-5-HT sont discutées. Deux nouvelles méthodes d'analyse sont décrites, ce sont l'analyse par absorption en ultra-violet et la spectrométrie de rémission directe sur plaques de chromatographie en couche mince.

Les déviations standard des deux méthodes sont meilleures de 50%. En outre, les autres méthodes connues donnent des résultats plus élevés.

Literatur

1. *Wurziger, J.* und *Harms, U.:* Kaffee- und Tee-Markt **19**, Heft 6, S. 9 (1965).
2. *Wurziger, J.* und *Kurz G.:* Sonderdruck: Referat von 5ème Colloque Intern. sur la Chimie des Cafés, Lissabon, 14.—19. Juni 1971.
3. *Harms, U.:* Beiträge zum Vorkommen und zur Bestimmung von C-5-HT in Kaffeebohnen. Dissertation, Hamburg 1968.
4. *Harms, U.* und *Wurziger, J.:* Carbonsäure-5-(hydroxy)-tryptamide in Kaffeebohnen. Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch. **138**, 75—80 (1968).
5. *Kresze, G.:* Physikalische Methoden in der organischen Chemie, 2. Teil. Sammlung Göschen Bd. 45/45a, S. 91. Berlin 1962.

P. Kummer
Dr. E. Bürgin
Laboratorium der Coffex AG
CH-8200 Schaffhausen