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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 48 (1957)

Heft: 2

Artikel: Zur Bestimmung von Koffein in koffeinfreiem Kaffee

Autor: Hadorn, H. / Suter, H.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-983769

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: 12.07.2025

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

Summary

Description of a method for the determination of boric acid in boric acid-containing fertilizers by flame spectrophotometry. Before the determination, the anions and cations, with the exception of $BO_3^{=}$ and $CO_3^{=}$, are removed from the solution of the fertilizer by passage through a column of ion exchangers.

Bibliographie

Bovay, E. et *Cossy, A.* 1955. Dosage de K, Ca, Mg, Na dans les cendres végétales par spectrophotométrie de flamme. Trav. Chim. alim. Hyg. **46** (6): 540—568.

Schütz, E. 1953. Beitrag zur massanalytischen Borbestimmung in Düngmitteln mit Hilfe von Ionenaustauschharzen. Trav. Chim. alim. Hyg. **44** (2): 213—226.

Zur Bestimmung von Koffein in koffeinfreiem Kaffee

Von *H. Hadorn* und *H. Suter*

(Laboratorium VSK, Basel)

1. Einleitung

Ueber die Bestimmung des Koffeins in Roh- und Röstkaffee sind bereits zahlreiche Arbeiten [1]) publiziert worden. Fast alle Bestimmungsverfahren beruhen auf der Extraktion des Koffeins mit bestimmten Lösungsmitteln, meist nach einer Vorbehandlung des Kaffees mit Ammoniak oder Alkali, um das an Chlorogensäure chemisch gebundene Koffein abzuspalten. Es folgt dann ein recht umständlicher Reinigungsprozess, und schliesslich wird das mehr oder weniger reine Koffein gewogen oder der Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl* bestimmt und auf Reinkoffein umgerechnet.

Entkoffeinierter Kaffee enthält nur noch Spuren von Koffein, 0,02 bis höchstens 0,1 %. Alle bisher bekannten Koffeinbestimmungsmethoden, welche bei gewöhnlichem Kaffee brauchbare Resultate liefern, befriedigen nicht, wenn man sie auf «koffeinfreien» Kaffee zu übertragen versucht. Wegen des sehr geringen Koffeingehaltes des Untersuchungsmaterials muss die Einwaage erhöht werden. Die Operationen des Aufschliessens und Extrahierens werden unhandlich und umständlich. Zudem gelingt es nur sehr schwer, einem entkoffeinierten Kaffee die letzten Reste Koffein mittels Extraktionsmitteln zu entziehen, da gerösteter Kaffee ein grosses Adsorptionsvermögen besitzt und das Koffein hartnäckig zurückhält. Bei der anschliessenden Reinigung sind stets grosse Mengen Fett und andere Begleitstoffe zu entfernen, mit denen leicht auch ein Teil des Koffeins verloren geht. Am Schluss der verschiedenen Operationen erhält man wenige Milligramme Koffein, welche stets mit merklichen Mengen

anderer Stoffe verunreinigt sind. Die gravimetrisch ermittelten Resultate sind daher recht unzuverlässig und meistens zu hoch. Auch die Kjeldahlbestimmung ist bei sehr kleinen Mengen ungenau.

Um den Koffeingehalt in entkoffeiniertem Kaffee zuverlässig bestimmen zu können, müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: Erstens muss ein Aufschluss- oder Extraktionsverfahren gefunden werden, welches auch die letzten Spuren Koffein aus dem gemahlenen Kaffee herausholt. Zweitens müssen wir eine zuverlässige und spezifische Methode finden, welche die Bestimmung kleiner Mengen Koffein (0,5—3 mg) mit genügender Genauigkeit gestattet.

Ein Aufschlussverfahren, welches uns als erfolgversprechend erschien, aber bisher kaum beachtet worden ist, hat *Cortes* [2]) beschrieben: Der gemahlene Kaffee (1 g) wird mit konz. Schwefelsäure vermischt und auf dem Wasserbad erhitzt. Dabei verkohlt der grösste Teil der organischen Substanz, ohne dass Koffein abgebaut oder sonstwie verändert wird. Die Masse wird mit Wasser verdünnt, filtriert, das Koffein ausgewaschen und schliesslich aus der wässerigen Phase mit Chloroform ausgeschüttelt. Durch einige Abänderungen liess sich das Verfahren verbessern, so dass es auch für entkoffeinierten Kaffee anwendbar war.

Die Ausarbeitung einer zuverlässigen Methode zur Bestimmung kleiner Koffeinmengen bereitete uns viel Mühe. Sowohl gravimetrische als auch titrimetrische Verfahren, wie beispielswiese die Methode nach *Hagedorn* [3]) sind bei Koffeinmengen in der Grössenordnung von einem Milligramm viel zu ungenau. Es kommen daher nur kolorimetrische Verfahren in Betracht, welche allerdings für Koffein spezifisch sein müssen. Die kolorimetrische Koffein-Mikrobestimmung von *Denigès* [4]), eine modifizierte Murexidreaktion, liefert nach *Richter* [5]) schlecht reproduzierbare Resultate. Schliesslich haben wir eine von *Richter* empfohlene Methode so weit modifiziert, dass sie für unsere Zwecke brauchbar war. Sie beruht auf der Fällung des Koffeins mit Jod als Koffeinperjodid der Formel $C_8H_{10}O_2N_4 \cdot HJ \cdot J_4$. Diese schwarze kristalline Verbindung wird abfiltriert oder auszentrifugiert, in Alkohol gelöst und die entstehende gelbe Jodlösung kolorimetriert.

In der vorstehenden Arbeit soll zunächst die kolorimetrische Koffeinbestimmung überprüft werden. Dann folgen Versuche mit der Aufschlussmethode nach *Cortes*, sowie Modellversuche und Analysenresultate von koffeinfreiem Kaffee des Handels. Am Schluss soll unsere neue Arbeitsvorschrift ausführlich wiedergegeben werden.

2. Kolorimetrische Koffeinbestimmung

Richter [5]) beschreibt eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Koffein in Kaffee- oder Teeaufgüssen. Das Koffein wird zunächst, wie üblich, in alkalischem Milieu mit Chloroform extrahiert und dann in Wasser gelöst. Die Arbeitsweise nach *Richter* für die kolorimetrische Bestimmung ist kurz folgende:

In einen Glassintertiegel G 4 gibt man der Reihe nach 2 ml 16%ige Schwefelsäure, 2ml 0,1n-Jodlösung, 5 ml der Koffeinlösung, welche 0,5 bis 2 mg Koffein enthalten soll, und schwenkt um. Es fällt sofort ein schwarzer Niederschlag von Koffeinperjodid aus ($C_8H_{10}O_2N_4 \cdot HJ \cdot J_4$). Nach etwa 1 Minute wird unter Verwendung eines Saugtopfes filtriert und während etwa 2 Minuten Luft durch den Rückstand gesaugt, um das am Niederschlag und in den Filterporen haftende überschüssige Jod zu entfernen. Anschliessend stellt man die Wasserstrahlpumpe ab und bringt in den gereinigten Saugtopf ein 50 ml-Becherglas oder Reagensglas, gibt zu dem Koffeinperjodid 25 ml Methylalkohol und saugt langsam ab. Das Koffein wird unter Zersetzung gelöst und der Alkohol gelb gefärbt. Der Filtertiegel wird mit 25 ml Wasser nachgewaschen und die gelbe Alkohol-Wasser-Mischung (wir haben jeweils im 50 ml-Messkolben bis zur Marke aufgefüllt) unter Verwendung der 2 cm-Küvette mit dem Filter S 47 im Pulfrich-Photometer photometriert.

Die Methode weist in obiger Ausführung verschiedene Mängel auf, und es ist uns nur ausnahmsweise gelungen, einigermassen reproduzierbare Resultate zu erhalten.

a) Lösungsmittel

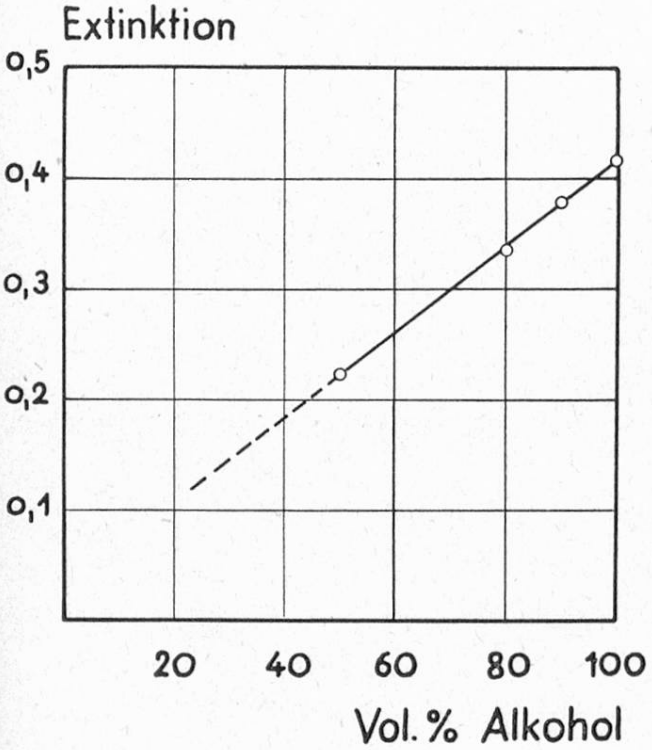

Fig. 1

Abhängigkeit der Extinktion von der Alkoholkonzentration

(0,6 mg Koffein, gefällt als Perjodid, gelöst in je 50 ml Aethylalkohol; Extinktion gemessen bei 400 mμ)

Methanol ist zwar ein sehr gutes Lösungsmittel für das Koffeinperjodid, besitzt aber neben seiner Giftigkeit noch andere unangenehme Eigenschaften. Die Extinktion der Lösungen ist stark temperaturabhängig und verändert sich während der Messung oft beträchtlich. Ferner entstehen in der empfohlenen Mischung von 1 Teil Methylalkohol und 1 Teil Wasser während des Photometrierens in den Küvetten spontan Gasblasen, was recht lästig ist. Die Extinktion ist zudem stark von der Alkoholkonzentration abhängig. Sie ist beispielsweise in absolutem Methylalkohol ca. 1,7mal grösser als in 50 vol.%igem Methylalkohol. Beim Durchsaugen der Lösung durch den Sintertiegel verdunsten stets wechselnde Mengen Alkohol, so dass die Alkoholkonzentration in der zu photometrierenden Endlösung weder genau bekannt, noch konstant ist. Beim

Verdünnen der methylalkoholischen Lösung des Perjodids mit Wasser erfolgt eine Volumenverminderung, verbunden mit einer beträchtlichen Erwärmung. Auch beobachtet man gelegentlich, besonders bei grösseren Koffeinmengen (2 mg) schwache Trübungen. Derartige Lösungen sind unbrauchbar. Wir haben aus den genannten Gründen als Lösungsmittel nicht Methyl-, sondern Aethylalkohol benutzt. Um stets unter genau reproduzierbaren Bedingungen arbeiten zu können, haben wir uns entschlossen, absoluten Aethylalkohol zu verwenden. Die Abhängigkeit der Extinktion von der Alkoholkonzentration ist in Fig. 1 dargestellt.

In absolutem Aethylalkohol ist die Extinktion nahezu doppelt so gross wie in 50 vol.%igem Alkohol.

b) Absorptionsspektrum

Das Absorptionsmaximum einer Koffeinperjodidlösung in absolutem Alkohol liegt im Ultraviolett bei 360 mμ (vgl. Fig. 2). Der Kurvenverlauf in Ultraviolett und das Absorptionsmaximum stimmen genau überein mit einer Lösung von reinem Jod in absolutem Alkohol. Erst im sichtbaren Bereich, bei einer Wellenlänge von 430 mμ, überschneiden sich die Kurven, was aber für die photometrische Bestimmung ohne Bedeutung ist.

Das Koffeinperjodid wird vermutlich in alkoholischer Lösung vollständig in Koffein und Jod gespalten. Diese Lösung gehorcht dem *Beer*schen Gesetz.

Die grösste Empfindlichkeit bei photometrischen Messungen erzielt man, wenn die Extinktion im Absorptionsmaximum ermittelt wird. Für die Fällung des Koffeins als Perjodid erwies sich der Bereich von 0,5 bis 2 mg als optimal. Die entstehenden Mengen Perjodid, gelöst in 50 ml absolutem Alkohol, zeigen aber im Absorptionsmaximum bei 360 mμ und bei einer Schichtdicke von 1 cm viel zu hohe Extinktionen. Aus praktischen Gründen erwies sich für unsere Zwecke die Wellenlänge 400 mμ als günstig. Alle unsere weiteren Messungen sind im Beckmann-Spektralphotometer B bei 400 mμ, einer Schichtdicke von 1 cm und in absolutem Alkohol durchgeführt worden.

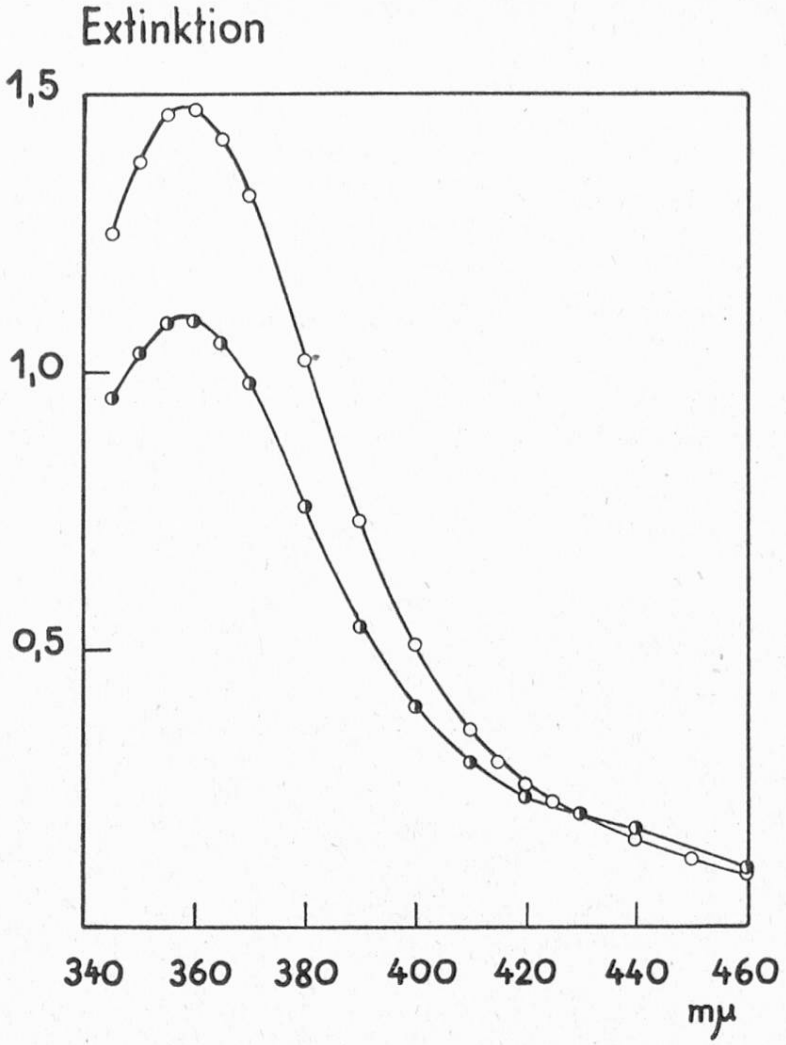

Fig. 2

Obere Kurve = Absorptionsspektrum von 3,82 mg Jod in 100 ml absolutem Alkohol
Untere Kurve = Absorptionsspektrum von 0,6 mg Koffein, gefällt als Perjodid und gelöst in 50 ml absolutem Alkohol

c) Bedingungen für die Ausfällung des Koffeins als Perjodid

Wie erwähnt, haben wir nach der Vorschrift von *Richter* nicht befriedigend reproduzierbare Werte erhalten. Nach der Originalvorschrift wird das Perjodid im Glassintertiegel gefällt und die Flüssigkeit abgesaugt. Ohne den Niederschlag auszuwaschen, saugt man während 2 Minuten Luft hindurch, wodurch das anhaftende Jod verdunsten sollte. Es zeigte sich aber, dass bei den von uns verwendeten Glassintertiegeln (Jenaer 1 G 4) nach dieser Behandlung jeweils noch merkliche Mengen überschüssige Jodlösung in der Sintermasse zurückblieben, was zu stark schwankenden Werten führte. In der Arbeit von *Richter* fehlen übrigens Zahlenangaben, aus welchen die Streuung der Methode ersichtlich wäre. In der dort abgebildeten Eichkurve, einer Geraden, welche

durch den Nullpunkt geht, sind keine Messpunkte eingezeichnet. Eichkurven, welche durch den Nullpunkt gehen, wurden nach unseren Versuchen überhaupt nie erhalten.

Auswaschen. Die Schwankungen werden wesentlich verringert, wenn man den Koffeinperjodid-Niederschlag nach dem Absaugen der überstehenden Lösung mit genau 1 ml verdünnter Schwefelsäure nachwäscht.

Die Eichkurve, welche vorher gekrümmt war, verläuft nun als Gerade aber wesentlich tiefer. Sie schneidet die Ordinate unterhalb des Nullpunktes, was auf Verluste an Perjodid infolge seiner Löslichkeit im wässerigen Medium zurückzuführen ist (siehe Fig. 3). Das Flüssigkeitsvolumen bei der Fällung hat einen Einfluss auf das Resultat, was auf die Löslichkeit des Perjodids zurückzuführen ist und durch folgende Versuche bestätigt wird:

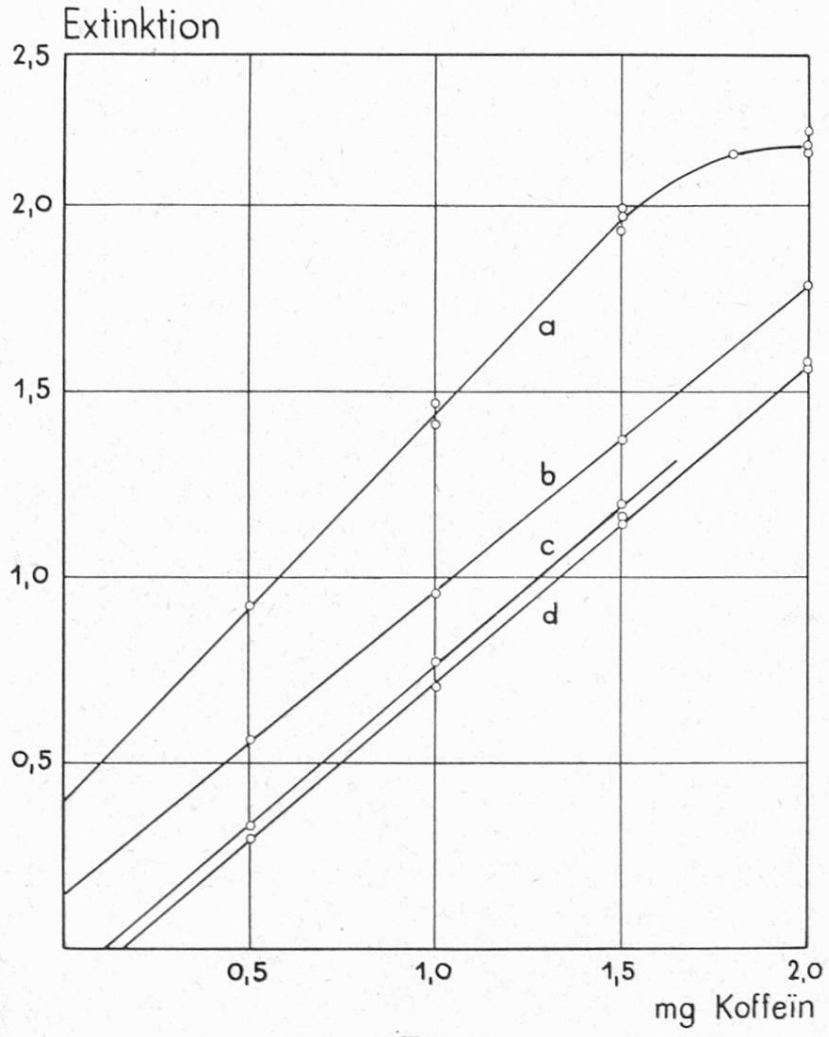

Fig. 3

Eichkurve für verschiedene Fällungsbedingungen des Koffeinperjodids

a) Fällung im Sintertiegel ohne Auswaschen (nach Vorschrift *Richter*)
b) Fällung im Zentrifugenröhrchen, ohne Auswaschen
c) Fällung im Sintertiegel, mit 1 ml verdünnter Schwefelsäure ausgewaschen
d) Fällung im Zentrifugenröhrchen, mit 1 ml verdünnter Schwefelsäure ausgewaschen

Je 1 mg Koffein wurde mit 2,0 ml 16%iger Schwefelsäure, 2 ml 0,1n-Jodlösung nach der Vorschrift von *Richter* als Koffeinperjodid gefällt, wobei vor der Fällung jeweils eine wechselnde Menge Wasser zugegeben wurde.

Volumen des Reaktionsgemisches	Extinktion
9,0 ml	0,740
12,0 ml	0,692

Je grösser das Flüssigkeitsvolumen, umso niedriger ist die Extinktion der Perjodidlösung. Es ist somit wichtig, dass bei allen Versuchen das Flüssigkeitsvolumen konstant gehalten wird. Nach der Vorschrift von *Richter* stimmt das Volumen der Reaktionsflüssigkeit bei der Eichkurve und der endgültigen Arbeitsvorschrift für Kaffee nicht ganz überein, weil die aus dem Kaffeeaufguss gewonnene wässerige Koffeinlösung (5 ml) filtriert und das Filter mit 1 ml Schwefelsäure und 1 ml Wasser ausgewaschen werden soll. Das Endvolumen des Reaktionsgemisches beträgt 11 ml, während es bei den Versuchen zur Bestimmung der Eichkurve nur 9 ml beträgt. Dieser Umstand muss zu ungenauen Resultaten führen.

Diese Tiegelmethode hat aber nie ganz befriedigt, weil die Reproduzierbarkeit der Resultate zu wünschen übrig liess. Dies ist zweifellos auf die Sinterplatte des Tiegels zurückzuführen, da diese stets eine gewisse Menge jodhaltige Flüssigkeit zurückhält.

d) Fällung im Zentrifugenröhrchen

Wir haben daher versucht, das Koffeinperjodid anstatt im Glassintertiegel in einem Zentrifugenröhrchen (Spitzröhrchen) zu fällen. Diese Technik hat den Vorteil, dass man das Flüssigkeitsvolumen leicht konstant halten, bedeutend schneller arbeiten und mehrere Proben gleichzeitig ansetzen kann. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und bildet am Boden des Röhrchens eine schwarze, fest haftende Schicht. Die klare, überstehende Lösung wird vorsichtig abgegossen und der Niederschlag mit 1 ml verdünnter Schwefelsäure gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Abgiessen der Waschflüssigkeit löst man den Niederschlag in absolutem Alkohol und verdünnt auf 50 ml. Die Zentrifugenmethode liefert praktisch gleiche Resultate wie die Fällung im Glassintertiegel. Wegen der Löslichkeit des Perjodids in der wässerigen Reaktionslösung erwies es sich als günstig, das Flüssigkeitsvolumen möglichst klein zu halten. Wir verdünnten bei unseren weiteren Versuchen auf 7,5 ml Endlösung. Statt 2 ml 0,1n-Jodlösung setzten wir 0,5 ml 0,5n-Jodlösung zu.

In Fig. 3 sind einige unter verschiedenen Bedingungen aufgenommene Eichkurven wiedergegeben. Kurve a wurde nach *Richter* im Sintertiegel ohne Auswaschen erhalten. Sie verläuft am höchsten und schneidet die Ordinate bei einer Extinktion von ca. 0,35, was auf anhaftendes Jod zurückzuführen ist. Die Kurve ist gekrümmt und die einzelnen Messpunkte streuen stark.

Kurve b wurde im Zentrifugenröhrchen ohne Auswaschen des Perjodids erhalten. Sie verläuft als Gerade wesentlich tiefer als Kurve a und schneidet die Ordinate bei Extinktion 0,15. Die dem Niederschlag anhaftende Jodmenge ist wesentlich vermindert. Nachdem der Niederschlag ausgewaschen wurde, verlaufen die Kurven noch tiefer, die Messpunkte stimmen aber einigermassen überein, gleichgültig ob im Sintertiegel (Kurve c) oder im Zentrifugenröhrchen (Kurve d) gearbeitet wird.

Die Löslichkeit des Koffeinperjodids in der überstehenden Lösung und in der Waschflüssigkeit ist auch abhängig von der Temperatur. Um stets unter gleichen Bedingungen zu arbeiten, stellten wir die Zentrifugenröhrchen mit dem fertigen Reaktionsgemisch während 5 Minuten in Eiswasser und zentrifugierten anschliessend. Die Extinktionen sind etwas höher und die Werte besser reproduzierbar, als wenn bei Zimmertemperatur gearbeitet wird.

3. Aufschluss des Kaffees und Extraktion des Koffeins

Wie bereits erwähnt, wird nach der Methode *Cortes* [2]) das Kaffeepulver mit konz. Schwefelsäure vermischt und auf dem Wasserbad erhitzt. Der grösste Teil der organischen Substanz verkohlt, ähnlich wie im Anfangsstadium bei einem Kjeldahl-Aufschluss. Interessanterweise wird das Koffein durch konz. Schwefelsäure bei Wasserbadtemperatur nicht zerstört, was durch Modellversuche bestätigt wurde. Die aufgeschlossene, stark verkohlte Masse wird nach *Cortes* mit heissem Wasser verdünnt, filtriert und die Kohle auf dem Filter mehrmals mit verdünnter Schwefelsäure ausgewaschen. Das Filtrat wird mit Natronlauge neutralisiert und hierauf das Koffein mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels hinterbleibt ziemlich reines Koffein.

Die Methode wurde zunächst an einem gewöhnlichen koffeinhaltigen Kaffee (Robusta) ausprobiert. Der Aufschluss erfolgte mit 1 g bzw. 2 g Kaffee genau nach *Cortes*. Die Kohle auf dem Filter wurde 4—5 mal mit sehr verdünnter heisser Schwefelsäure ausgewaschen. Im Filtrat haben wir nach *Cortes* das Koffein mit Chloroform ausgeschüttelt und bestimmt. Da bekanntlich Kohle ein gutes Adsorptionsmittel ist und auch Koffein in merklichen Mengen adsorbieren kann, haben wir zur Kontrolle die nach *Cortes* vorschriftsgemäss ausgewaschene Kohle samt Filter in einem Extraktionsapparat während 2 Stunden mit Wasser heiss extrahiert. Diese Lösung haben wir gesondert mit Chloroform ausgeschüttelt und nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels noch beträchtliche Mengen Koffeinkristalle erhalten. Ueber die Mengenverhältnisse und Koffeinausbeuten der 1. und 2. Extraktion gibt die Tabelle 1 Aufschluss.

20 bzw. 26 % des gesamten Rohkoffeins waren an der Kohle adsorbiert und liessen sich nachträglich noch extrahieren. Die Kohle wurde hierauf erneut während 2 Stunden mit heissem Wasser extrahiert. Diese Lösung enthielt aber keine nachweisbaren Mengen Koffein mehr.

Tabelle 1

Koffeinbestimmung in Robusta-Kaffee nach der Methode Cortes

	1. Versuch mit 1 g Kaffee		2. Versuch mit 2 g Kaffee	
	mg	%	mg	%
Rohkoffein im wässerigen Filtrat nach *Cortes*	16,8	1,68	29,1	1,46
Rohkoffein nach Extraktion der Kohle	4,2	0,42	10,3	0,51
Total Rohkoffein	21,0	2,10	39,4	1,97
Reinkoffein nach *Kjeldahl*	—	1,85	—	1,82
Reinkoffein nach kolorimetr. Methode	—	1,81	—	1,77
Anteil des an der Kohle adsorbierten Koffeins in % des Rohkoffeins	—	20	—	26

Das nach *Cortes* isolierte Rohkoffein war gelblich gefärbt. Zur Bestimmung des Reinkoffeins vereinigten wir die beiden Rückstände, lösten sie in 50 ml Wasser und bestimmten in einem aliquoten Teil (5 ml bzw. 2,5 ml) das Reinkoffein kolorimetrisch. Ein anderer Teil wurde für die Kjeldahl-Bestimmung benutzt. Die beiden Methoden ergaben gut übereinstimmende Werte. Das nach *Cortes* isolierte Rohkoffein enthielt ca. 90 % Koffein.

Das Aufschlussverfahren nach *Cortes* ist im Prinzip brauchbar, die entstehende Kohle adsorbiert aber beträchtliche Mengen Koffein (ca. 20 % des gesamten Koffeins), welche nur durch eine lang andauernde Extraktion isoliert werden können. Das erhaltene Rohkoffein ist stets mit mehr oder weniger grossen Mengen anderer Stoffe verunreinigt, so dass eine weitere Reinigung angezeigt ist.

Die zum Aufschliessen benützte Schwefelsäuremenge wurde etwas variiert. Sie ist ohne Einfluss auf das Resultat. Am günstigsten erwiesen sich 1—1,5 ml konz. Schwefelsäure auf je 1 g Kaffee. Mit diesem Verhältnis erhält man eine ziemlich trockene und voluminöse Kohle, die sich mit einem Glasstab leicht zu einem Pulver verreiben lässt. Mit mehr Schwefelsäure erhält man zähflüssige Massen, und beim Verdünnen mit Wasser entstehen grobe Klumpen von Kohlestücken, die sich schwieriger extrahieren lassen.

Ungünstiger als bei gewöhnlichem Röstkaffee liegen die Verhältnisse bei entkoffeiniertem Kaffee. In Modellversuchen haben wir je 1 g eines Kaffeezusatzes (Cichorie) mit bekannten Mengen Koffein (0,5 bzw. 2,0 mg) versetzt, dann nach *Cortes* mit Schwefelsäure aufgeschlossen, mit 40—50 ml Wasser verdünnt, filtriert und die Kohle viermal heiss ausgewaschen. Im schwefelsauren Filtrat wurde nur ein Bruchteil des zugesetzten Koffeins wiedergefunden, der Rest blieb an der Kohle adsorbiert, wie aus den Werten der Tabelle 2 hervorgeht.

Tabelle 2

Modellversuche mit Cichorie und Koffein

Zu je 1 g Kaffeezusatz zugegebene Menge Koffein	Im Filtrat gefunden	Verlust	Koffein-Ausbeute
mg	mg	mg	%
0	0	0	—
0,5	0,14	0,36	28
2,0	1,25	0,75	62,5

Die Verluste infolge Adsorption des Koffeins an der Kohle sind beträchtlich. Besonders bei geringen Gehalten, wie dies bei entkoffeiniertem Kaffee der Fall ist, sind die Werte völlig unbrauchbar.

Anschliessend haben wir in einem entkoffeinierten Kaffee das Koffein, wie oben beschrieben, nach *Cortes* bestimmt. Die abfiltrierte und ausgewaschene Kohle wurde erschöpfend mit heissem Wasser extrahiert und die beiden Lösungen getrennt aufgearbeitet. Eine gravimetrische Bestimmung des Rohkoffeins wäre bei koffeinfreiem Kaffee sinnlos, da die Verunreinigungen, welche mit dem Koffein in den Chloroformauszug gelangen, ein Mehrfaches der Koffeinmenge betragen können. Das Reinkoffein wurde deshalb in den beiden getrennt aufgearbeiteten Fraktionen kolorimetrisch bestimmt. Unsere Analyse ergab folgende Werte (Einwaage von 2,00 g koffeinfreiem Kaffee):

Koffein im schwefelsauren Filtrat	=	0,51 mg
An Kohle adsorbiertes Koffein (nach 2stündiger Extraktion)	=	0,25 mg
Summe	=	0,76 mg
Koffeingehalt im Kaffee	=	0,038 %

Bei zwei weiteren Versuchen mit dem gleichen Kaffee haben wir das schwefelsaure Filtrat und die nach 2stündiger Extraktion der Kohle erhaltene Extraktlösung vereinigt und gemeinsam aufgearbeitet. Wir fanden in recht guter Uebereinstimmung folgende Koffeingehalte:

0,036 % 0,034 %.

Reinigung des Rohkoffeins. Die Chloroformauszüge hinterlassen nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels mehr oder weniger stark mit Fett, Wachs und braunen Verbindungen verunreinigtes Rohkoffein. Für die kolorimetrische Bestimmung muss das Koffein in Wasser gelöst werden. *Richter* löst das Koffein zunächst in wenig Chloroform und spült es quantitativ in ein 50 ml-Becherglas, das 5 ml Wasser enthält. Nun wird vorsichtig erwärmt, bis das Chloroform vollständig verdunstet ist, die wässerige Lösung filtriert und weiter verarbeitet. Auf Zusatz von Schwefelsäure und Jodlösung fällt das Koffeinperjodid aus und wird entweder abfiltriert oder auszentrifugiert.

Es hat sich nun gezeigt, dass gewisse Verunreinigungen, die dem Koffein anhaften, in die wässerige Lösung gelangen und mit Jodlösung ebenfalls ausgefällt werden. Das Koffeinperjodid ist dann etwas schleimig anstatt schön kristallin und lässt sich nicht gut auswaschen. Als Folge davon werden bei der kolorimetrischen Bestimmung, die bekanntlich auf der Messung der gelbbraunen Jodfärbung beruht, zu hohe, schlecht reproduzierbare Werte gefunden.

Tabelle 3

Modellversuche mit 2,0 g Cichorie und bekannten Mengen Koffein
Kolorimetrische Bestimmung mit und ohne chromatographische Reinigung

Versuchsanordnung	Koffein zugegeben	Koffein gefunden	Fehler	
	mg	mg	mg	%
ohne chromatographische Reinigung	0,50	0,525	+ 0,025	+ 5
	0,50	0,600	+ 0,10	+ 20
	2,00	2,17	+ 0,17	+ 6
	2,00	2,12	+ 0,12	+ 8,5
mit chromatographischer Reinigung	0,50	0,480	— 0,02	— 4
	1,00	0,980	— 0,02	— 2
	1,00	0,983	— 0,017	— 1,7
	1,50	1,48	— 0,02	— 1,3
	2,00	1,96	— 0,04	— 2

Die dem Koffein anhaftenden braunen Verunreinigungen lassen sich weitgehend entfernen, wenn die Chloroformlösung durch eine Säule von Aluminiumoxyd filtriert wird, wie wir dies früher [6]) bei einer gravimetrischen Koffeinbestimmung angegeben haben.

Zur Reinigung der geringen Mengen Koffein, wie sie aus koffeinfreiem Kaffee erhalten werden, genügt eine kleine Säule mit 1,5 bis 2 g Aluminiumoxyd. Die Säule muss mit ammoniakhaltigem, trockenem Chloroform ammoniakalisch gemacht werden. Das Koffein wird in wenigen ml Chloroform gelöst, durchfiltriert und die Säule mit 20 ml trockenem Chloroform nachgewaschen, worauf sich das Koffein praktisch quantitativ im Eluat befindet, was durch folgende Versuche bestätigt wird.

Koffein zugegeben	Koffein im Eluat (kolorimetrisch bestimmt)
0,50 mg	0,48 mg
1,00 mg	0,97 mg
1,50 mg	1,50 mg

In einer Reihe von Modellversuchen haben wir zu je 2 g Cichorie bekannte Mengen Koffein zugesetzt und dann nach der am Schluss dieser Arbeit angegebenen Methodik gearbeitet. Die Resultate sind in Tabelle 3 angegeben. Während man ohne chromatographische Reinigung schwankende, um 5 bis 20 %

zu hohe Werte findet, erhält man nach chromatographischer Reinigung gleichmässige, um 1 bis 4 % zu niedrige Werte. Verluste von dieser Grössenordnung sind nach all den nötigen Operationen verständlich und auf das Resultat ohne Bedeutung.

In Tabelle 4 sind Analysen verschiedener koffeinfreier Kaffees des Handels wiedergegeben, und zwar ebenfalls mit und ohne chromatographische Reinigung.

Tabelle 4

Koffeinbestimmung in koffeinfreien Kaffees des Handels

Bezeichnung	Einwaage	ohne chromatographische Reinigung	mit chromatographischer Reinigung
	g	%	%
A	2	0,027	0,0183
	3	0,039	0,0183
	3	0,038	
Z	2	0,092	0,063
U	2	0,037	0,025

Ohne chromatographische Reinigung findet man durchwegs beträchtlich höhere Werte.

Zur weiteren Kontrolle der Methode haben wir zu 2 g des koffeinfreien Kaffees A 0,50 mg Koffein zugesetzt, dann mit Schwefelsäure aufgeschlossen und das Koffein genau, wie in Abschnitt Methodik beschrieben, bestimmt. Wir fanden 0,83 mg Koffein, was befriedigend mit dem Sollwert übereinstimmt.

Koffein in 2 g Kaffee A	=	0,365 mg
Koffein zugesetzt	=	0,50 mg
Summe (Sollwert)	=	0,865 mg
gefunden	=	0,83 mg

Die Methode ist etwas umständlich und zeitraubend, liefert aber zuverlässige Resultate, was durch die Modellversuche bewiesen wird.

4. Untersuchung von entkoffeiniertem Kaffee des Handels

Wir haben entkoffeinierten Kaffee des Handels, welche alle unter verschiedenen Marken verkauft werden, nach unserer neuen Methode untersucht.

Der Koffeingehalt der diversen Produkte variiert innerhalb weiter Grenzen (0,01—0,12 %). Nach Art. 294 der Lebensmittelverordnung muss der Koffeingehalt von koffeinfreiem Kaffee auf mindestens 0,10 % herabgesetzt sein. Mit Ausnahme des Kaffees D- welcher 0,12 % Koffein enthält, entsprechen alle Muster diesen Anforderungen.

Interessehalber haben wir auch noch das wässerige Extrakt nach der Lebensmittelbuchmethode ermittelt und in der Tabelle 5 angegeben. Der von der Lebensmittelverordnung verlangte Mindestgehalt von 20 % wird von allen Mustern wesentlich überschritten.

Tabelle 5

Koffein- und Extraktgehalt verschiedener koffeinfreier Kaffees des Handels

Bezeichnung	Koffein	Wässeriges Extrakt
	%	%
A	0,0183 0,0182	24,9
Z	0,0633	26,0
U	0,025	24,8
K	0,012	25,3
V	0,0406	25,3
D	0,118 0,120	25,2
H	0,011	24,8
N	0,012	24,8

Koffeingehalt von ungeröstetem entkoffeiniertem Kaffee

Die koffeinfreien Kaffees kommen ausnahmslos in geröstetem Zustand in den Detailverkauf. Meistens handelt es sich dabei um Mischungen verschiedener Sorten. Wir haben einen entkoffeinierten Santos- und Haiti-Kaffee vor und nach dem Rösten analysiert. Um den Rohkaffee leichter mahlen zu können, haben wir die Bohnen im Trockenschrank bei 100° getrocknet. Die Koffeingehalte der beiden Kaffees vor und nach dem Rösten, sowie der Röstverlust sind in Tabelle 6 angegeben. Beim Rösten steigt der Koffeingehalt scheinbar an, was aber durch den Gewichtsverlust beim Rösten zu erklären ist.

Tabelle 6

Koffeingehalt von koffeinfreiem Kaffee vor und nach dem Rösten

Sorte	Röstverlust (trockener Rohkaffee, geröstet)	Koffeingehalt in getrocknetem Rohkaffee	Koffeingehalt in geröstetem Kaffee	Koffeingehalt des ungerösteten Kaffees, umgerechnet auf geröstete Bohnen
	%	%	%	%
Santos	9,3	0,021	0,025	0,023
Haiti	9,4	0,018	0,026	0,020

5. Methodik

Prinzip

Das Kaffepulver wird mit konz. Schwefelsäure auf dem Wasserbad aufgeschlossen, mit Wasser verdünnt, dann filtriert und der Rückstand erschöpfend ausgewaschen, wobei das Koffein in Lösung geht. Nach dem Neutralisieren schüttelt man die Lösung mit Chloroform aus und erhält nach dem Verdampfen des Chloroforms das Rohkoffein. Das Reinkoffein bestimmt man nach einer chromatographischen Reinigung, indem man mit Jod das Koffein-Tetrajodid fällt, dieses in Alkohol löst und die Farbintensität misst.

Ausführung

Aufschluss und Extraktion

2 g des gemahlenen Kaffees versetzt man in einem 50 ml-Becherglas mit 2—3 ml konz. Schwefelsäure und rührt mittels eines Glasstabes, bis das Kaffeepulver gleichmässig durchfeuchtet ist. Die Masse wird nun während 15—20 Minuten unter gelegentlichem Umrühren auf einem siedenden Wasserbad erhitzt, indem man das Becherglas möglichst weit in den Dampfraum einhängt. Die organische Substanz verkohlt dabei weitgehend. Man verreibt sie mit dem Glasstab zu einem möglichst feinen Pulver, verdünnt mit ca. 30 ml siedendem Wasser, rührt gut auf und lässt etwa 5 Minuten auf dem Wasserbad stehen. Dann filtriert man durch ein Faltenfilter (⌀ 12,5 cm), bringt die Kohle quantitativ aufs Filter und wäscht mit insgesamt ca. 20 ml Wasser nach. Das klare, meist gelblich gefärbte Filtrat, welches einen Teil des Koffeins enthält, wird aufbewahrt. Da die verkohlte Masse beträchtliche Mengen Koffein adsorbiert, welche sich nur sehr langsam auswaschen lassen, wird das Filter samt Rückstand heiss extrahiert. Man stellt das feuchte Filter in ein kleineres, trockenes Faltenfilter (⌀ 10 cm) und bringt es samt diesem Schutzfilter in einen Extraktionsapparat nach *Pritzker* und *Jungkunz*. Man gibt 20—30 ml heisses Wasser zu, erhitzt das Kölbchen während 3 Stunden, so dass das Kondenswasser ziemlich rasch vom Kühler tropft (30—60 Tropfen pro Minute). Um Wärmeverluste zu vermeiden, wird der zylindrische Teil der Extraktionsapparatur mit einer mehrfachen Lage von Zeitungspapier umwickelt. Das Extraktionsrohr ist leicht geneigt einzuspannen und gelegentlich zu drehen, damit das vom Kühler abtropfende Wasser alle Teile der im Faltenfilter vorhandenen Kohle gut extrahiert. Erfahrungsgemäss ist nach 3 Stunden die Extraktion des Koffeins beendet.

Die wässerige Extraktlösung im Kölbchen wird mit dem Filtrat vom Aufschluss vereinigt und die stark saure Lösung mit 30 %iger Natronlauge und Methylorange als Indikator neutralisiert. Man führt die Lösung in einen Perforator nach *Pritzker* und *Jungkunz* über, versetzt mit 1—2 ml konz. Ammoniak und perforiert während 2—3 Stunden mit Chloroform. Man kann das Koffein aus der ammoniakalischen Lösung auch im Scheidetrichter ausschütteln, indem man einmal mit 50 ml und zweimal mit je 25 ml Chloroform schüttelt. Die

Chloroformauszüge destilliert man aus einem 100 ml-Kölbchen ab. Es hinterbleibt in der Regel kristallisierendes, schwach gelbgefärbtes Rohkoffein, welches mit fett- oder wachsartigen Substanzen verunreinigt ist.

Chromatographische Reinigung

Das Aluminiumoxyd nach *Brockmann* wird mit verdünnter Salpetersäure schwach befeuchtet, dann geglüht, im Exsikkator abgekühlt und mit ammoniakalischem Chloroform befeuchtet. 1,5—2 g dieses aktivierten Aluminiumoxyds werden in ein unten verengtes und mit Wattebausch verschlossenes Glasrohr von 1 cm lichter Weite gegeben, mit 2—3 ml mit Ammoniak gesättigtem, trockenem Chloroform befeuchtet. Das Rohkoffein wird in 3—5 ml Chloroform gelöst, durch die vorbereitete Säule filtriert und mit 20—25 ml trockenem Chloroform nachgewaschen. Das Filtrat wird in einem 50 ml-Erlenmeyerkölbchen gesammelt und das Lösungsmittel auf dem Wasserbad abdestilliert. Es hinterbleiben meistens gelbgefärbte, mit etwas Fett oder Wachs verunreinigte Koffeinkristalle.

Das Koffein wird in ca. 2 ml Chloroform gelöst und unter Nachspülen des Kölbchens mit Chloroform quantitativ in ein 50 ml-Becherglas übergeführt. Man gibt ca. 2 ml Wasser, 1,0 ml 16%ige Schwefelsäure, sowie ein winziges Siedesteinchen zu und erwärmt das Becherglas unter gelegentlichem Umschwenken vorsichtig auf dem Wasserbad, bis das Chloroform restlos verjagt ist. Das Koffein befindet sich nun in der wässerigen Lösung. Ist dieselbe klar, so kann sie ohne weiteres für die kolorimetrische Bestimmung verwendet werden, andernfalls muss sie filtriert werden.

Fällung des Koffeinperjodids im Zentrifugenröhrchen

In einem Zentrifugenröhrchen (Spitzröhrchen) von 15 ml Inhalt, das bei 7 ml eine Marke trägt, bringt man die wässerige, schwefelsaure Koffeinlösung. Das Becherglas wird zunächst mit 1,0 ml 16%iger Schwefelsäure und dann mehrmals mit wenig Wasser ausgespült, bis das Flüssigkeitsvolumen im Zentrifugenröhrchen 7,0 ml beträgt. Nun setzt man 0,5 ml 0,5n-Jodlösung zu, verschliesst mit einem schwach eingefetteten Gummistopfen, mischt gut durch und stellt das offene Zentrifugenröhrchen während 5 Minuten in Eiswasser. Hierauf wird sofort während 3 Minuten kräftig zentrifugiert. Das ausgeschiedene Koffeinperjodid bildet eine schwarze kristallinische Schicht am Boden des Gläschens, während die überstehende braune Lösung vollständig klar sein soll. Sie wird vorsichtig abgegossen, das Gläschen wiederum in Eiswasser gestellt und als Waschflüssigkeit 1 ml eisgekühlte 4%ige Schwefelsäure mittels Pipette zugegeben. Durch Umschwenken und sorgfältiges Schütteln wird der Niederschlag möglichst gut aufgewirbelt und nochmals zentrifugiert. Die Waschflüssigkeit wird wiederum abgegossen, die letzten Tropfen mit Filtrierpapier aufgesaugt und der Niederschlag in absolutem Alkohol gelöst und quantitativ in ein 50 ml-Messkölbchen übergeführt und mit absolutem Alkohol bis zur Marke aufgefüllt.

Kolorimetrie

Die alkoholische Lösung des Koffeinperjodids darf nie im direkten Sonnenlicht stehen, weil sonst die Intensität rasch abnimmt. Im Dunkeln aufbewahrt, bleibt die Extinktion während Stunden konstant. Im Beckmann-Photometer misst man die Extinktion bei 400 mμ in der 1 cm-Küvette gegen eine mit Wasser oder Alkohol gefüllte Vergleichsküvette.

Eichkurve

Die Eichkurve wird in analoger Weise wie der beschriebene Hauptversuch im Zentrifugenröhrchen ausgeführt. Man benutzt eine wässerige Koffeinlösung, welche in 1 ml 1,00 mg Koffein enthält. In einer Reihe mit steigendem Koffeingehalt misst man in verschiedene Zentrifugenröhrchen 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ml Koffeinlösung ab, gibt je 2 ml 16%ige Schwefelsäure zu und verdünnt mit Wasser auf 7,0 ml. Dann versetzt man mit je 0,5 ml 0,5n-Jodlösung, mischt wie oben und stellt die Gläser während 5 Minuten in Eiswasser. Anschliessend wird zentrifugiert, der Perjodid-Niederschlag mit 1 ml eisgekühlter 4%iger Schwefelsäure ausgewaschen und dann in absolutem Alkohol gelöst. Die im Messkolben auf 50 ml verdünnten Lösungen werden bei 400 mμ photometriert. Die Eichkurve verläuft linear.

Nach obiger Vorschrift haben wir für die Eichkurve folgende Extinktionen gefunden:

mg Koffein	Extinktion
0,50	0,355
1,00	0,785
1,50	1,215
2,00	1,660
2,50	2,080

Zusammenfassung

1. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Koffeinbestimmung in Röstkaffee befriedigen nicht, wenn man sie auf entkoffeinierten Kaffee anwendet. Das Koffein lässt sich nur unvollständig aus dem Kaffee extrahieren, und das isolierte Koffein, meistens sind es nur wenige Milligramme, ist in der Regel stark verunreinigt.
2. Ein von *Richter* beschriebenes Verfahren zur Bestimmung geringer Koffeinmengen, bei welchem man das Koffein als Perjodid abscheidet und in alkoholischer Lösung photometriert, wurde überprüft und verbessert.
3. Eine von *Cortes* vorgeschlagene Methode zur Koffeinbestimmung wurde überprüft. Das Kaffeepulver wird zunächst mit konz. Schwefelsäure aufgeschlossen, dann mit Wasser verdünnt, filtriert und das Koffein aus dem wässerigen Filtrat mit Chloroform ausgeschüttelt. Es wird gezeigt, dass die Kohle beträchtliche Mengen Koffein adsorbiert und die Werte daher zu niedrig ausfallen.

4. Das Aufschlussverfahren von *Cortes* wurde verbessert, das Rohkoffein chromatographisch gereinigt und schliesslich nach der modifizierten kolorimetrischen Methode von *Richter* bestimmt. Auf diese Weise gelingt es, in 2—3 g entkoffeiniertem Kaffee den Koffeingehalt zuverlässig zu bestimmen.
5. Die Brauchbarkeit der neuen, leider etwas umständlichen Methode wird durch Modellversuche und zahlreiche Analysen von koffeinfreiem Handelskaffee belegt.

Résumé

1. La méthode de dosage de la caféine dans le café rôti, décrite dans la littérature, ne donne pas de résultats satisfaisants quant on l'applique au café décaféiné. La caféine n'est extraite de ce dernier qu'incomplètement et sous forme fortement impure.
2. On a examiné et amélioré la méthode de *Richter* pour le dosage de faibles quantités de caféine, qui consiste à isoler la caféine comme periodure et à la doser photométriquement, en solution alcoolique.
3. La méthode de dosage de la caféine, proposée par *Cortes*, a été examinée. La poudre de café est d'abord désagrégée avec de l'acide sulfurique concentré, puis on dilue avec de l'eau, filtre, et extrait la caféine du filtrat avec du chloroforme. On a trouvé que le charbon, qui se forme au cours du traitement avec l'acide sulfurique, adsorbe des quantités considérables de caféine ce qui conduit à des résultats trop faibles.
4. Le procédé de désagrégation de *Cortes* a été amélioré et la caféine brute a éte purifiée par chromatographie et finalement dosée selon la méthode colorimétrique de *Richter* modifiée. En procédant ainsi on peut doser exactement la caféine dans 2 à 3 g de café décaféiné.
5. Cette nouvelle méthode a été contrôlée sur des mélanges préparés soi-même et appliquée à de nombreuses analyses d'un café décaféiné du commerce.

Summary

Description of a new method for the determination of coffein in coffein-free coffee. It is a combination of *Cortes'* and *Richter's* methods, both improved. The coffein is purified by chromatography and determined colorimetrically. It is thus possible to determine accurately the coffein content of 2—3 g of coffein-free coffee. The development of this new method was necessary because the method of determination of coffein in roasted coffee, described in the literature, did not give satisfactory results when applied to coffein-free coffee.

Literatur

[1]) Handbuch der Lebensmittelchemie Bd. **6**, 38, J. Springer, Berlin (1934).
[2]) *F. F. Cortes,* Rev. Soc. brasil. Chim. **4**, 105 (1933); Z.U.L. **74**, 106 (1937).
[3]) *P. Hagedorn,* Deutsche Apotheker-Zeitung **92**, 430 (1952); Ref. Ztschr. analyt. Chem. **139**, 315 (1953).
[4]) *G. Denigès,* Compt. rend. **199**, 1622 (1934)). Ref. Ztschr. analyt. Chem. **107**, 296 (1936).
[5]) *J. Richter,* Z.U.L. **98**, 107 (1954).
[6]) *H. Hadorn* und *R. Jungkunz,* diese Mitt. **40**, 190 (1949).