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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 56 (1965)

Heft: 1

Artikel: Überprüfung der Coffein-Bestimmungsmethode nach Levine

Autor: Hadorn, H. / Zürcher, K.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982183

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: 02.07.2025

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

Überprüfung der Coffein-Bestimmungsmethode nach Levine

Von *H. Hadorn* und *K. Zürcher*

Laboratorium des Verbandes Schweiz. Konsumvereine (VSK), Basel

In der Literatur findet man sehr zahlreiche Methoden und Varianten zur Coffein-Bestimmung in Kaffee. Viele dieser Methoden sind empirisch und es haften ihnen gewisse systematische Fehler an. Besonders problematisch ist die Coffein-Bestimmung in entcoffeinierten Produkten, die nur noch Spuren von Coffein enthalten. Wir haben kürzlich eine UV-spektrophotometrische Methode zur Coffein-Bestimmung in Kaffee ausgearbeitet (1). Die Methode ist ziemlich zeitraubend, sie wurde aber eingehend überprüft und darf als zuverlässig und genau gelten. Sie eignet sich zur Kontrolle anderer Coffein-Bestimmungsmethoden. Von den zahlreichen, in der Literatur vorgeschlagenen Verfahren schien uns dasjenige von *Levine* (2) am besten geeignet für das neue Schweizerische Lebensmittelbuch (3). Die Methode beruht auf einer chromatographischen Abtrennung und UV-spektrophotometrischen Bestimmung des Coffeins. Sie ist genial einfach, rasch durchführbar und hauptsächlich für Einzelanalysen geeignet.

Wir haben diese Methode überprüft und in einigen Kaffeeprodukten den Coffein-Gehalt sowohl nach *Levine* als auch nach unserer Aufschlußmethode (1) bestimmt und dabei gut übereinstimmende Resultate erhalten. Am Schluß dieser Arbeit wird die Methode *Levine* mit einigen von uns eingefügten Präzisierungen wiedergegeben.

1. Prinzip der Methode Levine

Die Methode ist auf sämtliche Kaffeeprodukte, wie Rohkaffee, Röstkaffee, Kaffee-Extrakte (coffeinhaltig und entcoffeiniert) sowie auf Getränke anwendbar.

Ein aliquoter Teil eines wässerigen Auszuges oder einer Suspension des fein gemahlenen Produktes wird mit Natriumkarbonat alkalisch gemacht, dann mit Celite (Filterhilfsmittel) zu einem feuchten, homogenen Pulver verrieben. Diese Mischung von Celite und Untersuchungsmaterial füllt man in einem Chromatographier-Rohr auf eine vorbereitete Säule aus alkalischem Celite. Zunächst wird mit Aether eluiert. Das Eluat fließt direkt in ein darunter montiertes Chromatographier-Rohr mit einer Säule, bestehend aus Celite und Schwefelsäure (stationäre Phase). Das Coffein gelangt quantitativ in die saure Säule und wird darin zurückgehalten, während die ätherlöslichen Verunreinigungen, wie Fett, Kaffeewachs, usw. mit Aether ausgewaschen werden. Schließlich wird das Coffein aus der sauren Säule mit Chloroform eluiert, in einem Meßkölbchen aufgefangen und UV-spektrophotometrisch bestimmt.

2. Modellversuche mit reinem Coffein

Modellversuche mit reinem Coffein ergaben, daß das Coffein aus der oberen alkalischen Säule durch Aether quantitativ eluiert und in der unteren schwefelsauren Säule quantitativ zurückgehalten wird. Mit Chloroform ließ sich das Coffein mühelos und ohne Verluste eluieren.

3. Reinheit der Lösungsmittel

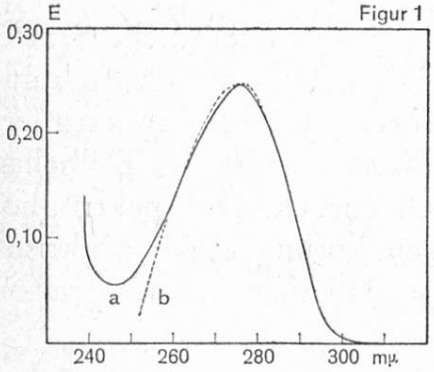
Die verwendeten Lösungsmittel müssen spektroskopisch rein sein. Chloroform ist vor Gebrauch frisch zu destillieren. Nach *Levine* müssen die Lösungsmittel zudem mit Wasser gesättigt sein, weil sie durch feuchte Celite-Säulen (stationäre Phase: Natronlauge bzw. Schwefelsäure) filtriert werden. Trockener Aether würde beträchtliche Mengen Wasser aus den Säulen aufnehmen und diese teilweise entwässern. In Chloroform sind jedoch nur Spuren Wasser löslich. Nach *Ullmann* (4) löst 1 kg Chloroform bei 25 ° C 0,565 g Wasser. Man darf, ohne Störungen befürchten zu müssen, zum Eluieren trockenes Chloroform verwenden. Die UV-Absorptionsspektren von trockenem und feuchtem Chloroform sind übrigens praktisch identisch, so daß auch bei der spektrophotometrischen Ausmessung keine besondere Rücksicht auf den Feuchtigkeitsgehalt des Chloroforms zu nehmen ist.

4. Wie wirkt Aether im Chloroform?

Die mit Aether ausgewaschene untere Säule enthält das gesamte Coffein. Dieses wird mit Chloroform eluiert. Dabei kann eine merkliche Menge Aether ins Eluat gelangen. Es wurde geprüft, ob dadurch keine Änderung der Extinktion erfolgt. In einem Blindversuch haben wir die untere, mit Schwefelsäure imprägnierte Celite-Säule vorerst mit Aether ausgewaschen und nach dem Abtropfen des Aethers mit Chloroform nachgewaschen und das Filtrat aufgefangen. An der Schlierenbildung im Kölbchen war zu erkennen, daß die ersten Anteile des Durchlaufs ziemlich viel Aether enthielten. Nachdem 50 ml Chloroform ausgeflossen waren, wurde der Durchlauf gut gemischt und das UV-Absorptionsspektrum gegen Luft gemessen. Im langwelligen UV (310—370 mμ) absorbiert die Chloroform-Aethermischung weniger stark als reines Chloroform. Zwischen 300 und 270 mμ sind zwischen der Aether-Chloroform-Mischung und reinem Chloroform keine Unterschiede feststellbar. Im kurzwelligen UV sind nur unbedeutende Unterschiede zu beobachten. Trockenes Chloroform zeigt etwas höhere Extinktion als das Aether-Chloroform-Gemisch. Wir fanden beispielsweise im Absorptionsmaximum (276 mμ) und im Absorptionsminimum (246 mμ) des Coffeins für die Lösungsmittel (1 cm Küvette) gegen Luft folgende Extinktionen:

	E_{246}	E_{276}
Chloroform trocken	0,94	0,55
Chloroform mit Wasser gesättigt	0,90	0,55
Chloroform-Aether-Mischung feucht	0,86	0,55

Um den Einfluß des Aethers genau zu verfolgen, haben wir die Absorptionskurven von je 0,5 mg Coffein in 100 ml reinem Chloroform und in 100 ml einer Chloroform-Aether-Mischung aufgenommen (80 Vol.% Chloroform + 20 Vol.% mit Wasser gesättigten Aether). In der Vergleichsküvette befand sich in beiden Fällen reines Chloroform. Die beiden Absorptionskurven sind in Figur 1 dargestellt. Im langwelligen UV bis zum Absorptionsmaximum (276 mμ) sind praktisch keine Unterschiede feststellbar. Nachher überschneiden sich die beiden Kurven, diejenige der ätherhaltigen Lösung fällt steil ab. Im Absorptionsminimum bei 246 mμ ist die Messung der ätherhaltigen Lösung gegen Chloroform nicht mehr möglich. Die Messung im Absorptionsmaximum, die wir für die eigentliche Coffein-Bestimmung benötigen, wird durch Aether nicht gestört. Die Korrektur des «Untergrundes» (siehe Abschnitt 8) wozu eine Messung im Absorptionsminimum (246 mμ) erforderlich ist, wird durch den Aether verunmöglicht.



Figur 1 Absorptionskurve von Coffein.

a) 0,5 mg Coffein in 100 ml Chloroform.
b) 0,5 mg Coffein in 100 ml Chloroform-Aether (80 Vol.% Chloroform + 20 Vol.% Aether).

Damit nur Spuren von Aether in das Eluat gelangen, haben wir jeweils vor dem Eluieren mit Chloroform einen schwachen Luftstrom von oben nach unten durch die mit Aether behandelte Säule gepreßt, bis unten kein Aether mehr abtropfte und praktisch keine Aether-Dämpfe mehr aus der Säule entwichen.

5. Reinheit des eluierten Coffeins

Die spektrophotometrische Coffein-Bestimmung liefert in der Regel nur richtige Werte, wenn das Coffein genügend rein ist. Die meisten Verunreinigungen zeigen im UV ebenfalls eine merkliche Absorption und verursachen daher zu hohe Resultate. Die Reinheit der Coffein-Chloroformlösung kann, analog wie früher für wässerige Lösungen beschrieben, kontrolliert werden. Das Absorptionsmaximum liegt bei 276 mμ. Ein Minimum liegt bei 246 mμ.

Bei reinem Coffein in reinstem Chloroform beträgt der Quotient $\frac{E_{246}}{E_{276}} \cdot 100 =$ 22,3. D. h., die Extinktion des Coffeins im Absorptionsminimum beträgt 22,3 % derjenigen im Absorptionsmaximum. Liegt dieser Quotient höher, so enthält die Lösung noch absorbierende Verunreinigungen.

Oberhalb 300 mμ zeigt Coffein praktisch keine Absorption mehr, während die meisten Verunreinigungen merklich absorbieren. Für reines Coffein in reinem Chloroform beträgt der Quotient $\frac{E_{300}}{E_{276}} \cdot 100 = 1{,}6$ %. Eine höhere Relation deutet auf Verunreinigungen hin.

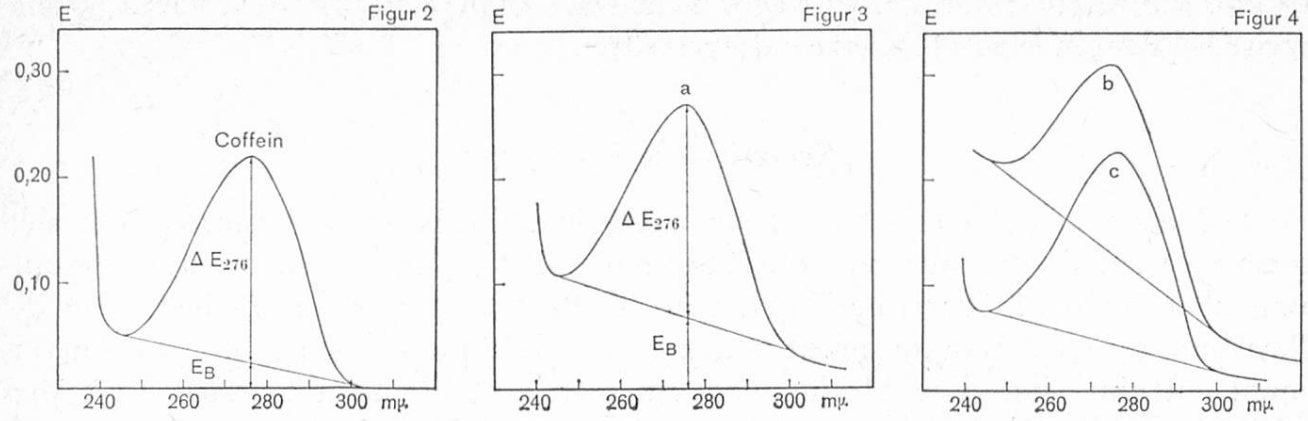
Durch gewisse Verunreinigung des Chloroforms und vor allem durch Aether, der beim Eluieren der Säule ins Eluat gelangen kann, wird die Extinktions-Messung im Absorptionsminimum bei 246 mμ gestört. Zum Eluieren muß reinstes, frisch destilliertes Chloroform verwendet werden und der Aether ist vorher möglichst vollständig aus der Säule zu entfernen.

6. Ausmessung in Wasser

Bei den Verunreinigungen des Coffeins handelt es sich um fettlösliche Stoffe, die möglicherweise in Wasser unlöslich sind. Analog wie bei unserer Aufschluß-Methode (1) haben wir im Eluat zunächst das Chloroform vorsichtig abdestilliert und den Rückstand in einer genau gemessenen Menge Wasser gelöst. Im Kölbchen blieb meistens ein fettartiger, wasserabstoßender Hauch zurück. Die spektrophotometrische Bestimmung des Coffeins in der wässerigen Lösung ergab praktisch die gleichen oder nur um eine Spur niedrigere Werte, so daß sich diese Operation nicht lohnt.

7. Korrektur des Untergrundes in Chloroformlösung

Durch gewisse Verunreinigungen, die im UV ebenfalls absorbieren, wird die Absorptionskurve in vielen Fällen etwas erhöht. Die direkte Berechnung des Coffein-Gehaltes aus der gemessenen Extinktion bei 276 mμ liefert daher zu hohe Werte. Die Erhöhung durch den sogenannten «Untergrund» läßt sich rechnerisch oder graphisch nach dem von *Kresze* (5) beschriebenen sogenannten Grundlinienverfahren (base line methode) korrigieren. Durch zwei, dem Absorptionsmaximum benachbarte Minima oder zwei andere geeignete Punkte zieht man eine Gerade (Grundlinie, Basislinie). Bei reinem Coffein in Chloroform (siehe Figur 2) legten wir die Basislinie durch das Absorptionsminimum (246 mμ) und die Absorption bei 300 mμ. E_B ist der Anteil der Extinktion (im Absorptionsmaximum bei 276 mμ) bis zur Basislinie. Durch absorbierende Verunreinigungen wird dieses Stück erhöht. Für die Berechnung des Coffeingehaltes wird nur der über dieser Basislinie liegende Extinktionsanteil, also $E_{276}—E_B$ berücksichtigt. Dieser Anteil ist dem



Figur 2 Absorptionskurve von 0,45 mg reinem Coffein in 100 ml Chloroform.
Figur 3 und 4 Kurven a, b und c sind Absorptionskurven von 3 verschiedenen reinen Auszügen aus dem gleichen entcoffeinierten Röstkaffee.

Coffeingehalt proportional. Bei reinem Coffein in Chloroform beträgt der Extinktionsanteil über der Basislinie E_{276}—E_B = 89,5 % der Gesamt-Extinktion E_{276}. Einem Extinktions-Anteil E_{276}—E_B von 1,00 entspricht auf Grund eigener Eichkurven ein Coffeingehalt von 2,30 mg in 100 ml Chloroform.

In Figur 3 ist die Absorptionskurve einer Coffein-Lösung dargestellt, die bei der Analyse eines entcoffeinierten Röstkaffees nach der Methode *Levine* erhalten wurde. Durch gewisse Verunreinigungen ist die ganze Kurve etwas überhöht. Wir zeichnen wiederum die Basis durch die Schnittpunkte der Absorptionskurve bei 246 mμ und 300 mμ. Das Stück E_B ist wegen den Verunreinigungen im Verhältnis zur Gesamtextinktion höher. Das graphisch ermittelte Kurvenstück über der Basislinie $\Delta E_{276} = E_{276}$—E_B ist dem wahren Coffeingehalt proportional. Der Coffeingehalt läßt sich mit Hilfe des obigen Faktors (2,30) berechnen.

2 weitere Absorptionskurven von Coffeinlösungen, die aus dem gleichen entcoffeinierten Röstkaffee erhalten wurden, sind in Figur 4 abgebildet. Vor allem die Kurve b ist stark überhöht. Die Lösung ist vermutlich durch unreine Lösungsmittel ziemlich stark verureinigt worden. Kurve c ist gegenüber der Absorptionskurve des reinen Coffeins (Figur 2) nur relativ wenig überhöht.

Wie sich die Korrektur des Untergrundes auf die Resultate auswirkt, ist aus den Zahlen der Tabelle 1 zu entnehmen. Ohne Korrektur werden gelegentlich stark streuende und zum Teil viel zu hohe Coffeingehalte gefunden. Nach der Korrektur liegen alle Resultate ziemlich nahe beieinander. Die Methode *Levine* und unsere Aufschlußmethode liefern praktisch die gleichen Resultate, obwohl das Coffein auf völlig verschiedene Art aus dem Kaffee isoliert und gereinigt wird.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Beispiele sind allerdings Extremfälle. Bei coffeinhaltigem Kaffee wird nach beiden Methoden praktisch reines Coffein erhalten, so daß die Korrektur überflüssig ist. Auch bei den entcoffeinierten Produkten erhält man bei sauberem Arbeiten mit reinen Lösungsmitteln ziemlich reines Coffein,

so daß die Korrekturen in der Regel nicht stark ins Gewicht fallen, wie beispielsweise bei dem in Figur 4, Kurve c dargestellten Versuch.

Rechnerische Korrektur

Die eben beschriebene Korrektur nach dem Grundlinienverfahren läßt sich auch rechnerisch durchführen. Hierüber hat *Smith* (6) anläßlich des 1. Kolloquiums über Kaffee in Paris berichtet. Um die Rechnung zu vereinfachen, muß die Basislinie durch 2 Punkte gelegt werden, die gleich weit vom Absorptionsmaximum entfernt sind. Die Messung an einer steil abfallenden Schulter, wie dies *Smith* vorschlägt, beispielsweise 296 mμ, ist mit größeren Meßfehlern und Ungenauigkeiten verbunden, weil sich minimalste Einstellfehler an der Wellenlängentrommel auf die Extinktion stark auswirken. Für die rechnerische Korrektur in Chloroformlösung würden wir folgende 3 Meßpunkte vorschlagen: E_{246} (Absorptionsminimum) E_{276} (Absorptionsmaximum) E_{306} in langwelligem UV. Die beiden äußeren Meßpunkte sind je um 30 mμ vom Maximum entfernt. Den über der Basislinie liegende Extinktions-Anteil Δ_{276} berechnet man wie folgt:

$$\Delta E_{276} = E_{276} - \frac{E_{246} + E_{306}}{2}$$

Tabelle 1

Coffein-Bestimmungen in entcoffeiniertem Röstkaffee
Einfluß der graphischen Korrektur

	Methode Levine			Aufschlußmethode Hadorn und Zürcher	
	Coffein-Gehalt ohne Korr. mg%	Korrigierte Werte mg%	In Figur 2 bzw. 3 Kurve	Coffeingehalt ohne Korr. mg%	Korr. Werte mg%
Santos					
Einzelwerte	28,0	23,3	a	34,2	19,7
	32,0	21,2	b	30,7	20,0
	22,8	21,2	c	24,9	21,6
	31,9	22,3	—	25,5	23,0
Mittelwert	**28,7**	**22,0**	—	—	**21,1**
Standardabweichung	± 4,7	± 1,0		—	± 1,5
Columbia					
Einzelwerte	29,9	29,2	—	38,9	31,4
	29,9	28,8	—	34,8	31,1
				32,3	29,5
				35,1	31,3
Mittelwert	**29,9**	**29,0**	—	**35,3**	**30,8**
Standardabweichung	—	± 0,3	—	± 2,7	± 0,8

Zur Umrechnung in Coffein dient der Faktor 2,316. (Wenn $\Delta E_{276} = 1{,}00$ so enthält die Lösung 2,316 mg Coffein in 100 ml Chloroform, oder 1,158 mg in 50 ml.

Der kleine Unterschied gegenüber dem Faktor bei der graphischen Auswertung (2,30 mg/100 ml) rührt daher, weil die Basislinie nicht durch die gleichen Punkte gezogen worden ist.

8. Korrektur des Untergrundes in wässeriger Lösung

Nach der früher beschriebenen Aufschlußmethode (1) wird das isolierte und gereinigte Coffein in wässeriger Lösung ausgemessen (Absorptionsmaximum = 272 mμ). Bei entcoffeiniertem Kaffee werden oft auch etwas überhöhte Absorptionskurven erhalten. Die Korrektur läßt sich in der eben geschilderten Art ausführen. Wir wählten das graphische Verfahren. Gemessen wurde bei folgenden Wellenlängen: 246 mμ (Absorptionsminimum) 272 mμ (Absorptionsmaximum) und 300 mμ. Die Grundlinie wurde durch die Punkte 246 und 300 mμ gezogen. Bei reinem Coffein in Wasser beträgt bei 272 mμ (Absorptionsmaximum) der Extinktionsanteil ΔE_{272} über der Grundlinie 85,5 % der Gesamtextinktion E_{272}. Für die Berechnung des Coffeingehaltes aus der korrigierten Extinktion ΔE_{272} gilt der Faktor $\frac{2}{0{,}855} = 2{,}34$.

Wenn $\Delta E_{272} = 1{,}00$, so enthält die Lösung 2,34 mg Coffein in 100 ml. In der Tabelle 2 sind einige nach der Aufschlußmethode ermittelte Coffeingehalte von entcoffeiniertem Röstkaffee graphisch korrigiert worden. Die Resultate nach zwei voneinander unabhängigen Methoden stimmen, wie erwähnt, sehr gut miteinander überein.

9. Vergleichsanalysen

In verschiedenen Kaffee-Produkten (coffeinhaltig und entcoffeiniert) haben wir die Coffeingehalte nach der Methode *Levine* und nach unserer Aufschlußmethode bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Bei der Methode *Levine* sind die Einzelwerte, die von verschiedenen Analytikern gefunden wurden, angegeben. In einigen Fällen wurde auch die Korrektur für den Untergrund angebracht. Bei den coffeinhaltigen Produkten ändert das Resultat überhaupt nicht, bei den entcoffeinierten ergeben sich meistens nur unbedeutende Korrekturen. Die nach der Aufschlußmethode erhaltenen Werte sind unserer früheren Arbeit (1) entnommen.

Nach beiden Methoden erhält man sehr gut reproduzierbare und miteinander übereinstimmende Resultate. Damit dürfte bewiesen sein, daß die Methode *Levine*

zuverlässige und richtige Werte liefert. Sie ist genauer als zahlreiche, in neuerer Zeit vorgeschlagene, mehr empirische Verfahren. Für amtliche Laboratorien oder Betriebe, die ein UV-Spektralphotometer besitzen, kann die Methode *Levine* empfohlen werden. Sie wird auch für das neue Schweizerische Lebensmittelbuch vorgeschlagen. Im nächsten Abschnitt soll die Methode in allen Einzelheiten als Arbeitsvorschrift beschrieben werden, wobei einige Wiederholungen unvermeidlich sind.

Tabelle 2

Coffeinbestimmung in Kaffee-Produkten nach 2 verschiedenen Methoden

Produkt	Methode Levine		Aufschlußmethode Hadorn und Zürcher		
	Ohne Korrektur %	Nach Korrektur des Untergrundes %	Mittelwert %	Standard abweichung s	Anzahl Analysen N
Rohkaffee coffeinhaltig	2,51 2,54	— —	2,55	± 0,008	6
Röstkaffee coffeinhaltig	1,16 1,15	1,16 1,15	1,17	± 0,007	7
Kaffee-Extrakt coffeinhaltig	4,15 4,11	— —	4,13	± 0,011	7
entcoffeinierter Rohkaffee	0,0299 0,0299	0,0292 0,0288	0,034	± 0,0011	12
entcoffeinierter Röstkaffee	0,031 0,032	— —	0,034	± 0,0009	11
entcoffeinierter Kaffee-Extrakt	0,126 0,124	— 0,119	0,127	± 0,0033	7

Arbeitsvorschrift nach Levine

Prinzip

Ein salzsaurer, wässeriger Auszug oder eine Aufschlämmung des fein gemahlenen Produktes wird mit Natriumkarbonat versetzt, dann mit Celite zu einem feuchten homogenen Pulver verrieben. Diese Mischung von Untersuchungsmaterial und Celite wird in eine vorbereitete alkalische Chromatographier-Säule eingefüllt. Zunächst wird mit Aether eluiert. Das Eluat fließt direkt in eine darunter montierte zweite Säule mit Schwefelsäure-Celite (stationäre Phase). Das Coffein wird quantitativ in der sauren Säule zurückgehalten, die ätherlöslichen Verunreinigungen (Fett, Kaffeewachs, usw.) werden ausgewaschen. Schließlich wird das Coffein

aus der sauren Säule mit Chloroform eluiert, in einem Meßkölbchen aufgefangen und in UV spektrophotometrisch bestimmt.

Reagenzien

a) *Schwefelsäure* 4-n.
b) *Natronlauge* 2-n.
c) *Celite 545* (Filtererde) der Firma Johns-Manville Corp., zu beziehen durch Firma Schneider & Co. AG, Zeughausstraße, Winterthur.
d) *Aethyläther,* mit Wasser gesättigt.
e) *Chloroform* rein.

Geräte

a) Chromatographier-Rohre von 250 mm Länge, lichte Weite 21 mm und 17 mm, vorteilhaft mit Glashahnen.
b) *UV-Spektralphotometer.*

Vorbereitung der Probe

a) *Roh- und Röstkaffee* ca. 1 g fein gemahlener Kaffee wird mit 75 ml Wasser und 2 Tropfen konz. Salzsäure versetzt. Man kocht während 10 Minuten (leichtes Sieden), kühlt ab, führt das Gemisch in einen 100-ml Meßkolben und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. 2,0 ml dieser trüben Lösung werden zur weitern Untersuchung abpipettiert.

b) *Entcoffeinierter Roh- und Röstkaffee* 4 g des fein gemahlenen Materials werden nach a behandelt und die Lösung in einem 100-ml Meßkolben zur Marke aufgefüllt. 25 ml der trüben Aufschlämmung werden in eine Glasschale gebracht und auf dem Wasserbad auf ein Volumen von 4—5 ml eingeengt.

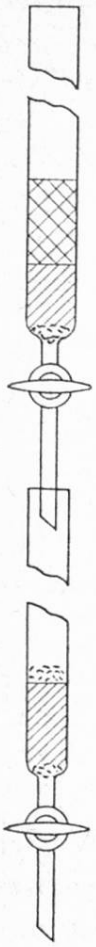
c) *Kaffee-Extrakt (Instant-Kaffee)* 0,5 g der Probe werden mit 25 ml heißem Wasser und 2 Tropfen konz. Salzsäure versetzt, auf dem Wasserbad erwärmt bis alles gelöst ist, dann in einen 100-ml Meßkolben übergeführt. 2,0 ml werden abpipettiert und zur weiteren Untersuchung verwendet.

d) *Entcoffeinierter Kaffee-Extrakt* 0,3—0,5 g Substanz werden in ein 50-ml Becherglas abgewogen, 5 ml Wasser und 1 Tropfen konz. Schwefelsäure zugegeben, dann auf dem Wasserbad erhitzt bis alles gelöst ist, abgekühlt und die gesamte Mischung weiterverarbeitet.

Füllung der Kolonnen (siehe Figur 5)

Kolonne I 2,0 g Celite werden in einem 50-ml Becherglas mit 2 ml 4-n Schwefelsäure versetzt. Mit einem flexiblen Spatel wird die Masse innig verrieben, bis

Figur 5



ein homogenes, leicht feuchtes Pulver erhalten wird. Dieses wird nun portionenweise in das unten mit Wattebausch oder Glaswolle verschlossene Rohr I eingefüllt. Mit einem flach gedrückten Glasstab wird die Celite-Masse leicht festgestampft, so daß eine gleichmäßige, homogene Schicht entsteht. Oben wir die Schicht mit einem Pfropfen aus Glaswolle zugedeckt, um Erosion zu verhindern.

Kolonne II. Lage A besteht aus 3 g Celite, die mit 2 ml 2-n Natronlauge innig verrieben wurden (wie bei Kolonne I beschrieben). Diese Schicht wird ebenfalls portionenweise eingefüllt und leicht gestampft, so daß sie völlig kompakt erscheint.

Lage B. Zu der im Abschnitt «Vorbereitung der Probe» nach a bis d erhaltenen Lösung oder Aufschlämmung des Untersuchungsmaterials gibt man in einem 50-ml Becherglas oder in einer Glasschale in kleinen Portionen wasserfreies Natriumkarbonat bis zur deutlich alkalischen Reaktion. Nun fügt man noch einen Überschuß von 0,5 g Natriumkarbonat zu. Erst wenn die Soda vollständig aufgelöst ist, gibt man zu n ml der Untersuchungsflüssigkeit (n = 2 bis 5 ml) portionenweise n + 1 g Celite zu, mischt die ganze Masse gut durch und füllt sie quantitativ in Kolonne II direkt auf die Lage A, wie oben beschrieben. Das Becherglas wird mit 1 g Celite trocken nachgespült.

Chromatographie

Die Kolonnen werden derart montiert, daß die aus Kolonne II ausfließende Flüssigkeit direkt auf die Kolonne I tropft. Zunächst läßt man 150 ml Aether durch Kolonne II und I fließen. Der Hahn bei Kolonne II bleibt ganz geöffnet, bei Kolonne I wird er so gestellt, daß ständig eine Flüsigkeitsschicht über dem Absorptionsmittel steht. Kolonne II wird entfernt und die Kolonne I mit weiteren 50 ml Aether nachgewaschen. Mit der ersten Portion Aether wird das Abflußrohr von Kolonne II in Kolonne I abgespült. Das unten bei Kolonne I ausfließende Eluat wird verworfen (Aether zurückgewinnen, nach Ausschütteln mit Ferrosulfat). Durch die Kolonne I preßt man mittels Gummigebläse eine zeitlang Luft von

oben hindurch, bis unten kein Aether mehr abtropft und die unten austretende Luft nur noch schwach nach Aether riecht. Anschließend eluiert man die Kolonne I mit ca. 50 ml Chloroform. Das Eluat mit dem reinen Coffein wird in einem 50 ml Meßkolben aufgefangen, zur Marke aufgefüllt und gemischt.

Spektrophotometrische Messung

Die Extinktion der Coffein-Chloroformlösung wird in 1-cm Quarzküvetten gegen reines Chloroform bei 276 mμ gemessen (Absorptionsmaximum). Zur Kontrolle der Reinheit des Coffeins werden auch die Extinktionen bei 246 mμ (Absorptionsminimum) und bei 306 mμ gemessen.

Berechnung

Bei coffeinhaltigen Produkten kann der Coffein-Gehalt direkt aus der im Absorptionsmaximum gemessenen Extinktion E_{276} berechnet werden. (Formel a) Bei entcoffeinierten Produkten enthält das Coffein noch Spuren von Verunreinigungen, es muß eine Korrektur des Untergrundes berücksichtigt werden. (Formel b).

a) *Ohne Korrektur* (bei coffeinhaltigen Produkten).
Coffein in mg/50 ml Chloroformlösung $= 1{,}03 \cdot E_{276}$.

b) *Mit Korrektur für den Untergrund* (bei entcoffeinierten Produkten).
Coffein in mg/50 ml Chloroformlösung $= 1{,}158 \left(E_{276} - \frac{E_{246} + E_{306}}{2}\right)$

Berechnungsbeispiel

Von einem fein gemahlenen, entcoffeinierten Rohkaffee wurden 4,00 g abgewogen, mit Wasser vorschriftsgemäß gekocht und auf 100 ml verdünnt. Von dieser wässerigen Suspension wurden 25 ml (entspricht 1,00 g Einwaage) vorschriftsgemäß aufgearbeitet. Die UV-spektrophotometrischen Messungen ergaben folgende Werte

$$E_{276} = 0{,}290$$
$$E_{246} = 0{,}078$$
$$E_{306} = 0{,}005$$

a) *Direkte Berechnung ohne Korrektur.* Coffein in mg pro 50 ml

Chloroformlösung $= 1{,}03 \cdot E_{276}$
$= 1{,}03 \cdot 0{,}290$
$= 0{,}299$ mg

In 1 g des des untersuchten Kaffees wurden 0,299 mg Coffein gefunden. Der Kaffee enthält somit **29,9 mg % Coffein.**

b) *Berechnung mit Korrektur für den Untergrund.* Coffein in mg pro 50 ml Chloroform-Lösung

$$= 1{,}158 \cdot \left(E_{276} - \frac{E_{246} + E_{306}}{2}\right)$$

$$= 1{,}158 \cdot \left(0{,}290 - \frac{0{,}078 + 0{,}005}{2}\right)$$

$$= 0{,}288 \text{ mg Coffein}$$

Im Kaffee = **28,8 mg % Coffein**

Zusammenfassung

1. Die UV-spektrophotometrische Methode zur Coffein-Bestimmung nach *Levine* wurde überprüft.

2. Die Methode liefert sehr gut reproduzierbare Resultate, die mit den nach der Aufschlußmethode von *Hadorn* und *Zürcher* erhaltenen übereinstimmen. Die Methode darf als zuverlässig und genau gelten.

3. Zur Korrektur des «Untergrundes», der von störenden absorbierenden Verunreinigungen herrührt, werden ein graphisches und ein rechnerisches Verfahren mitgeteilt.

Résumé

On a étudié la méthode de *Levine* pour le dosage de la caféine par spectrophotométrie dans l'UV et constaté qu'elle donne des valeurs reproductibles qui concordent avec celle données par la méthode de *Hadorn* et *Zürcher*. Cette méthode de *Levine* peut être considérée comme bonne et exacte.

Summary

Critical examination of the method of *Levine* for the UV-spectrophotometric determination of caffeine. It has been found that this method gives accurate results.

Literatur

1. *Hadorn H.* und *Zürcher K.:* Neue Methode zur Bestimmung des Coffein-Gehaltes in Roh- und Röstkaffee, Kaffee-Extrakten und entcoffeinierten Produkten. Diese Mitt. **55**, 379 (1964).
2. *Levine J.:* Journ. Assoc. off. Agric. Chem. (AOAC) **45**, 254 (1962).
3. Schweizerisches Lebensmittelbuch (provisorisches Ringbuch) 35. Kapitel Kaffee und Tee (zu beziehen durch das Eidg. Gesundheitsamt, Bern).
4. Ullmanns Encylclopädie der techn. Chemie, 5. Bd., S. 409 (1954). Verlag Urban & Schwarzenberg, München-Berlin.
5. *Kresze G.:* Physikalische Methoden in der organischen Chemie, 2. Teil, Sammlung Göschen, Bd. 45/45a, S. 91, Berlin (1962).
6. *Smith R. F.:* La détermination de la caféine, du café et des mélanges de café (Vortrag) Premier colloque international sur la chimie des cafés verts torréfiés et leurs derivés. Institut Français du Café et du Cacao, S. 55 (1963). Repris de «Café, Cacao, Thé» Vol. VII, No 3 und No 4 (1963).