UV-Spektrophotometrische Theobromin-Bestimmung in Kakao und Schokolade

Autor(en): **Hadorn, H. / Zürcher, K.**

Objekttyp: **Article**

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

Band (Jahr): **56 (1965)**

Heft 6

PDF erstellt am: **08.08.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982208

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

3. *Martens:* Bull. Soc. Chim. Biol. **9**, 454 (1927).
4. *Cocking E. C.* and *Yemm E. W.:* Biochem. J. **58**, xii (1954).
5. *Yemm E. W.* and *Cocking E. C.:* Analyst **80**, 209 (1955).
6. *Kalant H.:* Analyt. Chem. **28**, 265 (1956).
7. *van Slyke D. D.* et al.: J. biol. Chem. **141**, 671 (1941).
8. *van Slyke D. D.* et al.: J. biol. Chem. **141**, 627 (1941).
9. *Mason M. F.:* Biochem. J. 32, 719 (1938).
10. *Hine J.:* Reaktivität und Mechanismus in der org. Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1960, S. 279.
11. *Mc Caldin D. J.:* Chem. Rev. **60**, 39 (1960).
12. *Moore S., Spackman D. H.* and *Stein W. H.:* Analyt. Chem. **30**, 1185 (1958).
13. *Spackman D. H., Stein W. H.* and *Moore S.:* Analyt. Chem. **30**, 1190 (1958).

* Zitiert in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1953, 4 .Aufl. S. 688, 692.

UV-Spektrophotometrische Theobromin-Bestimmung in Kakao und Schokolade

Von *H. Hadorn* und *K. Zürcher*
Laboratorium des Verbandes schweiz. Konsumvereine (VSK) Basel

1. Einleitung

Die Theobromin-Bestimmung, oder genauer die Gesamt-Alkaloid-Bestimmung (Theobromin und Coffein), leistet wertvolle Dienste zur Berechnung der fettfreien Kakaomasse in kompliziert zusammengesetzten Kakao- und Schokoladenerzeugnissen. Es ist die einzige direkte Methode zur Berechnung der fettfreien Kakaomasse. Für die Theobromin-Bestimmung sind bereits zahlreiche, meistens recht umständliche und zeitraubende Methoden vorgeschlagen worden. Auf Grund eigener Untersuchungen (1, 2, 3) darf die von *Pritzker* und *Jungkunz* (4) ausgearbeitete und von uns etwas modifizierte Perforationsmethode als recht genau angesehen werden.

Eine einfachere, für Routineuntersuchungen rasch durchführbare spektrophotometrische Methode wäre jedoch sehr erwünscht. Da Theobromin und Coffein im Ultraviolett charakteristische, stark ausgeprägte Absorptionsbanden mit einem Maximum bei 272 nm aufweisen, sollte die UV-spektrophotometrische Bestimmung im Prinzip möglich sein.

Nach der Methode *Pritzker* und *Jungkunz* (4) wird die Kakaomasse oder die Schokolade zunächst mit Wasser und Magnesiumoxid gekocht und dann filtriert. Das meistens schwach opalisierende, gelblich gefärbte Filtrat enthält die Alkaloide

Theobromin und Coffein. In einem aliquoten Teil des Filtrates werden die Alkaloide mit Chloroform perforiert und schließlich nach *Kjeldahl* bestimmt. Orientierende Vorversuche haben ergeben, daß dieses Filtrat nach entsprechender Verdünnung im Ultraviolett eine sehr stark ausgeprägte, charakteristische Absorptionsbande der Alkaloide zeigt. Die Kurven waren aber ziemlich stark überhöht, was auf absorbierende Verunreinigungen hindeutet. Durch eine Klärung nach *Carrez* ließen sich diese störenden Verunreinigungen weitgehend entfernen, worauf man wesentlich bessere Kurven erhielt, die mit derjenigen von reinem Theobromin weitgehend übereinstimmten. In zahlreichen Kakaomassen und Schokoladen haben wir nach der eben skizzierten spektrophotometrischen Methode und nach der Perforationsmethode gut übereinstimmende Resultate erhalten. In vereinzelten Fällen wurden größere Unterschiede beobachtet, so daß sich eine Überprüfung der spektrophotometrischen Methode aufdrängte. Dabei zeigte sich, daß sowohl beim Aufschluß der Kakaomasse mit Magnesiumoxid als auch bei der anschließenden Klärung nach *Carrez* Theobromin-Verluste auftreten. Nach zahlreichen systematischen Versuchen wurde schließlich eine Methode ausgearbeitet, nach welcher man den Gesamtalkaloid-Gehalt (Summe aus Theobromin und Coffein) quantitativ, rasch und zuverlässig bestimmen kann. Bleiessig erwies sich für diesen Zweck als nahezu ideales Klärmittel.

2. UV-Absorptionskurven von Theobromin und Coffein

a) Reine Alkaloide

Die UV-Absorptionskurven von Theobromin und Coffein in neutraler oder schwach saurer Lösung sind sehr ähnlich. Beide Alkaloide zeigen ein Absorptionsmaximum bei 272 nm und ein Minimum bei 242 nm. Aus den Figuren 1 und 2 geht hervor, daß die Extinktion der Theobromin-Lösung (1 mg in 100 ml) im Absorptionsmaximum größer ist als die Extinktion einer Coffein-Lösung gleicher Konzentration. Für den molaren Extinktionsmodul ε ergeben sich jedoch für beide Alkaloide ganz ähnliche Werte

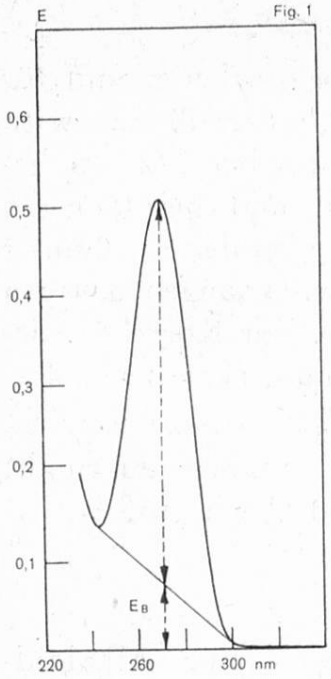
	$E^{1\,\%}_{1\,cm}$	molarer Extinktionsmodul ε
Theobromin	565	$1{,}02 \cdot 10^5$
Coffein	505	$0{,}98 \cdot 10^5$

Die Umrechnung von $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ in ε erfolgt mit folgender Formel, wobei M das Molekulargewicht bedeutet:

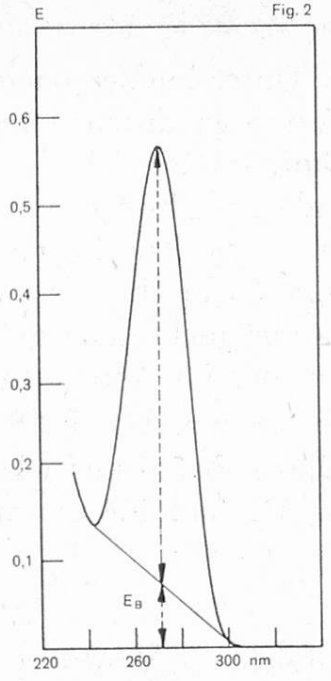
$$\varepsilon = 0{,}1 \cdot M \cdot E^{1\,\%}_{1\,cm}$$

b) Absorptionskurven von Kakaoauszügen

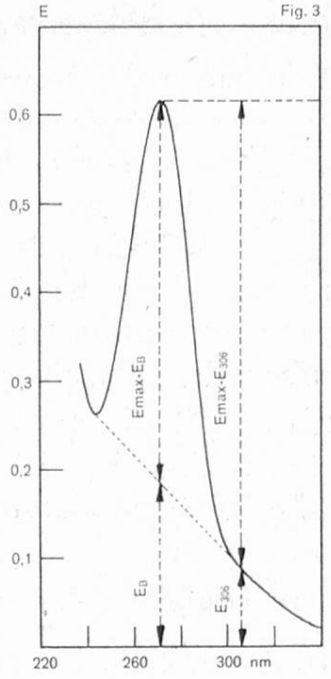
Die aus Kakao oder Schokolade erhaltenen Auszüge sind auch nach der Klärung mit *Carrez*-Lösung oder mit Bleiessig meistens noch mit Stoffen verunreinigt, die im UV ebenfalls absorbieren. Dadurch werden die Absorptionskurven etwas gehoben (siehe Figur 3). Um den störenden Einfluß des sogenannten «Untergrundes» auszuschalten, benützt man graphische oder rechnerische Verfahren.



UV-Absorptionsspektrum von reinem Theobromin
1 mg Theobromin + 0,5 ml HCl 10 % in 100 ml



UV-Absorptionsspektrum von reinem Coffein
1 mg Coffein + 0,5 ml HCl 10 % in 100 ml



UV-Absorptionskurve der Alkaloide aus Milchschokolade
100 ml Lösung entsprechen 0,6 g Schokolade

c) Graphische Korrektur des Untergrundes

Die Korrektur nach dem sogenannten Grundlinienverfahren ist bereits in einer früheren Arbeit (5) bei der Coffein-Bestimmung nach *Levine* (6) ausführlich beschrieben worden.

Wir ziehen die Grundlinie vom Absorptionsminimum ($E_{242}^{min.}$) bis zur Absorption bei 300 nm. Vom Absorptionsmaximum wird eine Linie senkrecht auf die Ordinate gezogen. Für die Berechnung des Theobromin-Gehaltes dient nur der über der Basislinie liegende Extinktionsanteil $E_{272}^{max.} - E_B$. Das Stück unter der Basislinie E_B kann je nach Verunreinigung größer oder kleiner ausfallen, was deutlich in den Figuren 2 und 3 ersichtlich ist. Aus den Absorptionskurven mit reinen Alkaloiden wurden die Umrechnungsfaktoren bestimmt. Multipliziert man den Extinktionsanteil über der Basislinie bis zum Maximum ($E_{272}^{max.} - E_B$) mit dem entsprechenden Faktor 2,07, erhält man den Theobromingehalt in mg/100 ml Lösung. Dieses Korrekturverfahren liefert nur zuverlässige Werte, wenn die UV-Absorptionskurve einen relativ geringen Untergrund aufweist. Wenn die Absorptionskurve der störenden Verunreinigungen zwischen 242 und 300 nm nicht linear verläuft, was in der Regel der Fall sein dürfte, ist die Grundlinien-Korrektur fehlerhaft.

Wie in Abschnitt 6c gezeigt wird, bewährte sich diese Art der Korrektur für Theobromin-Bestimmungen in Kakaoprodukten nicht in allen Fällen. Durch Fremdionen wird die Absorptionskurve des Theobromins im Bereich des Minimums verschoben, wodurch sich Fehler ergeben. Bei stark vanillierten Produkten erhält man ebenfalls verfälschte Resultate, weil die Absorptionsbanden des Vanillins stören.

d) Rechnerische Korrektur

Wir haben die Korrektur des Untergrundes nach einem einfacheren und für unsere Zwecke viel genaueren Verfahren durchgeführt. Durch Fremdionen wird die Absorptionskurve, wie erwähnt, im Bereich des Minimums bei 242 nm beeinflußt, jedoch nur unbedeutend im Absorptionsmaximum und bei längeren Wellen $>$ 300 nm. Lösungen von reinem Theobromin in Wasser oder verdünnter Säure absorbieren bei 306 nm nicht mehr. Bei verunreinigten Lösungen dagegen fällt die Absorptionskurve bei 306 nm nicht ganz auf null ab. Zur Korrektur des Untergrundes subtrahiert man von der im Absorptionsmaximum gemessenen Extinktion $E_{272}^{max.}$ die Extinktion bei 306 nm. Die Differenz $E_{272}^{max.}$—E_{306} entspricht der Extinktion der Alkaloide. Dieser Berechnung liegt die Annahme zugrunde, daß die Untergrundabsorption bei 272 und 306 nm annähernd gleich groß ist.

e) Berechnung der Faktoren

In der Tabelle 1 sind aus zahlreichen UV-Absorptionskurven reiner Alkaloid-Lösungen die Faktoren abgeleitet worden, die zur Berechnung der Alkaloide dienen. Die entsprechende Extinktion multipliziert mit dem Faktor ergibt den Alkaloidgehalt in mg pro 100 ml Endlösung. Je nachdem ob der Untergrund nach dem Grundlinienverfahren oder nach der rechnerischen Methode korrigiert wird, ist der eine oder andere Faktor zu verwenden.

Die Faktoren «ohne Korrektur» sind direkt aus der Extinktion im Absorptionsmaximum berechnet. Die Faktoren wie sie für das «Grundlinienverfahren» berechnet wurden, streuen etwas stärker, was auf die Verschiebung der Absorptionskurve im Minimum bei 242 nm zurückzuführen ist. Die Faktoren für die rechnerische Korrektur (E_{272}—E_{306}) stimmen beim Theobromin mit den Faktoren «ohne Korrektur» überein, weil reine Theobromin-Lösungen bei 306 nm nicht absorbieren.

3. Aufschluß mit Magnesiumoxid und über Adsorptionsverluste

Bei den in der Literatur beschriebenen Methoden zur Theobromin-Bestimmung wird die Kakaomasse zunächst mit Magnesiumoxid und Wasser in der Wärme behandelt. Dabei soll das chemisch gebundene Theobromin abgespalten werden. Bei der Überprüfung der Methode *Pritzker* und *Jungkunz* (4) zeigte sich, daß das Magnesiumoxid die unerwünschte Eigenschaft hat, auch Theobromin zu adsorbieren (3). Coffein wird an Magnesiumoxid überhaupt nicht adsorbiert. Der Einfluß der Magnesiumoxid-Menge auf die Adsorptionsverluste von Theobromin und Coffein wurde in einer neuen Versuchsreihe noch einmal geprüft.

Je 1,00 mg Alkaloid, gelöst in 100 ml Wasser, wurden mit steigenden Mengen Magnesiumoxid versetzt und der Kolben samt Inhalt gewogen. Hierauf wurde während 10 Minuten gekocht, abgekühlt, der Kolben wiederum gewogen und das verdampfte Wasser ersetzt, so daß in jedem Versuch am Schluß genau 100 g Wasser vorhanden waren. Nun

Tabelle 1 Faktoren zur Berechnung der Alkaloide

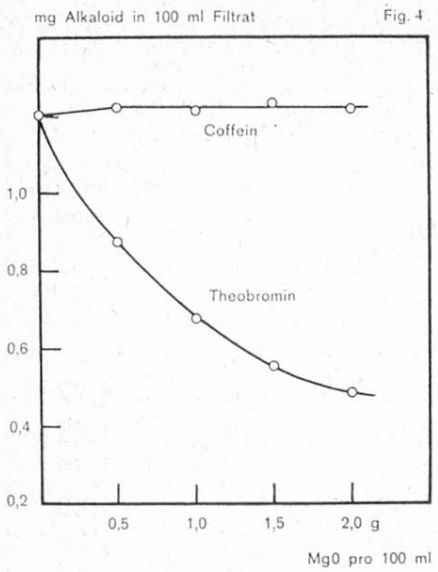
mg Alkaloid in 100 ml Lösung	Zusätze in 100 ml Lösung	pH-Wert der Endlösung	*Faktoren zur Berechnung (1 cm Küvette)		
			Ohne Korrektur	Grundlinienverfahren	Korrektur $E^{max.}_{272} - E_{306}$
Theobromin					
1,0	0,5 ml HCl 10 %	1,9	1,77	2,02	1,77
1,0	1 ml HCl 10 %	1,5	1,79	2,06	1,79
1,0	Bleiessig-Klärung	1,7	1,79	2,07	1,79
0,2	1 ml HCl 10 %	1,6	1,80	2,04	1,80
1,0	1 ml HCl 10 %	1,6	1,78	2,05	1,78
1,6	1 ml HCl 10 %	1,6	1,76	2,02	1,76
0,2	1 ml CH_3COOH 10 %	3,3	1,74	2,08	(1,74)
1,0	1 ml CH_3COOH 10 %	3,3	1,76	2,04	1,76
1,6	1 ml CH_3COOH 10 %	3,3	1,75	2,00	1,75
	Mittelwert		1,77	2,07**	1,77
Coffein					
1,0	0,5 ml HCl 10 %	2,0	1,97	2,30	1,97
1,0	1 ml HCl 10 %	1,55	1,99	2,34	1,99
1,0	Bleiessig-Klärung	1,7	2,00	2,36	2,00
0,2	1 ml HCl 10 %	1,5	1,98	2,47	1,98
1,0	1 ml HCl 10 %	1,6	1,96	2,34	1,98
1,6	1 ml HCl 10 %	1,6	1,98	2,34	1,99
0,2	1 ml CH_3COOH 10 %	3,2	1,82	2,38	(1,84)
1,0	1 ml CH_3COOH 10 %	2,9	1,91	2,32	(1,95)
1,6	1 ml CH_3COOH 10 %	2,7	1,98	2,25	(1,94)
	Mittelwert		1,98	2,35	1,98

* Die abgelesene, bzw. korrigierte Extinktion (1 cm Küvette) multipliziert mit dem entsprechenden Faktor ergibt den Gesamt-Alkaloid-Gehalt in mg Alkaloid pro 100 mi Lösung.

** (Wahrscheinlicher Wert).

wurde filtriert und der Alkaloid-Gehalt im Filtrat spektrophotometrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurde 1 mg Alkaloid mit 100 ml heißem Wasser, das mit Magnesiumoxid gesättigt war, während 10 Minuten gekocht und weiter verfahren, wie im Hauptversuch. Die bei diesem Versuch (ohne Adsorptionsverluste) gemessene Extinktion entsprach 100 % Alkaloid.

Die Adsorptionsverluste sind als Funktion der Magnesiumoxid-Menge in der Figur 4 dargestellt. Beim Theobromin sind die Verluste um so größer, je höher die Magnesiumoxid-Menge ist. Coffein wird unter den gleichen Bedingungen überhaupt nicht adsorbiert. Verschiedene Qualitäten von Magnesiumoxid zeigen übrigens ganz unterschiedliches Adsorptionsvermögen. Bei 7 Mustern Magnesiumoxid wechselnder Reinheit und verschiedener Provenienz variierten die Adsorp-



Adsorption von Theobromin und Coffein an Magnesiumoxid

tionsverluste zwischen 15,8 und 53,2 %, wenn auf 1 mg Alkaloid in 100 ml Lösung je 0,5 g Magnesiumoxid zugesetzt wurden.

Durch diese ganz erheblichen Theobrominverluste (bis 70 %) infolge Adsorption wird die Zuverlässigkeit all jener Methoden in Frage gestellt, die zum Aufschluß der Kakaomasse Magnesiumoxid verwenden.

Bei Kakao und Schokolade sind die Adsorptionsverluste jedoch viel geringer als bei Modellversuchen mit reinem Theobromin. Es wurde schon früher (3) gezeigt, daß unter den Bedingungen, wie sie *Pritzker* und *Jungkunz* bei ihrer Perforationsmethode vorschreiben, die Adsorptionsverluste, verursacht durch das Magnesiumoxid unbedeutend sind. Um diesen Widerspruch abzuklären, haben wir eine weitere Versuchsreihe angestellt.

Je 7,5 g Kakaomasse oder Schokolade und 100 ml Wasser wurden mit steigenden Mengen Magnesiumoxid während 10 Minuten gekocht, abgekühlt, das verdampfte Wasser ergänzt und die Lösung filtriert. Ein aliquoter Teil des Filtrates (1 bzw. 5 ml) wurde anschließend nach *Carrez* geklärt, auf 100 ml verdünnt und filtiert. Der Theobromingehalt wurde spektrophotometrisch bestimmt.

Die Resultate sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Mit steigender Magnesiumoxid-Menge beobachtet man bei allen Produkten eine deutliche Abnahme des Theobromin-Gehaltes. Dazu ist aber zu bemerken, daß mit extrem niedrigen Magnesiumoxidmengen (0,1—0,4 g) ein ungenügend gereinigtes, intensiv rotbraun gefärbtes Filtrat erhalten wurde. Die Farbstoffe wurden durch die anschließende *Carrez*-Klärung nur mangelhaft entfernt, wodurch bei der UV-Messung zu hohe Theobromingehalte vorgetäuscht werden. Nahezu farblose Filtrate erhält man erst, wenn auf 7,5 g Kakaomasse mindestens 0,5 g Magnesiumoxid zugesetzt werden. Mit Magnesiumoxid-Mengen zwischen 0,5 und 2,0 g werden durchwegs recht befriedigend übereinstimmende Resultate erhalten. Die Theobrominverluste durch Adsorption sind in diesem Bereich somit relativ gering. Erst mit extrem hohen Magnesiumoxid-Mengen von 5 bis 10 g treten erhebliche Verluste auf. Nach der kürzlich (3) neu überarbeiteten Perforationsmethode von *Pritzker* und *Jungkunz* werden auf 15 g Schokolade 3,0 g Magnesiumoxid zugesetzt, was 1,5 MgO in unserer Versuchsreihe der Tabelle 2 entspricht. Die Magnesiumoxid-Menge bei der Perforationsmethode liegt somit im Bereich, wo die Adsorption von Theobromin noch unbedeutend ist. Das Ausmaß der Adsorptionsverluste ist übrigens auch vom Kakaoprodukt und von der Qualität des verwendeten Magnesiumoxids abhängig. Dadurch läßt sich erklären, daß nach der Perforationsmethode in verschiedenen Laboratorien im gleichen Produkt gelegentlich ziemlich stark voneinander abweichende Werte gefunden werden, da sehr wahrscheinlich mit unterschiedlichen Qualitäten von Magnesium-

Tabelle 2

Einfluß der Magnesiumoxidmenge auf die Theobromin-Verluste durch Adsorption bei Kakao und Schokolade

Je 7,5 g Kakaomasse oder Schokolade wurden mit je 100 ml Wasser und steigenden Mengen MgO während 5 Minuten gekocht

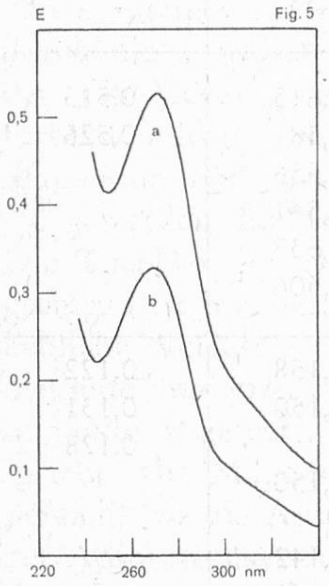
Bezeichnung des Untersuchungsmaterials	MgO für den Aufsschluß g	Aussehen der Filtrate		Theobromin UV-spektrophotometrisch	Theobromin nach Perforations-Methode %
		1. Filtrat nach MgO-Aufschluß	2. Filtrat nach Carrez-Klärung		
Kakaomasse	0,1	dunkel, fast schwarz	rötlich-braun	1,57	1,40 1,39 1,41 1,40
	0,2	dunkel, rot-braun trübe	gelb	1,50	
	0,4	bräunlich-rot, trüb	Spur gelb	1,50	
	0,5	gelblich-braun	Spur gelb	1,42	
	0,6	gelblich	farblos	1,42	
	0,75	gelblich	farblos	1,40	
	1,0	gelblich	farblos	1,42	
	2,0	hellgelb	farblos	1,41	
	5,0	hellgelb	farblos	1,36	
Milchfreie Schokolade	0,2	rot-braun	gelb	0,615	0,513
	0,4	gelb-braun	Spur gelb	0,581	0,526
	0,6	gelb-braun	farblos	0,556	
	1,0	gelb	farblos	0,541	
	2,0	hellgelb	farblos	0,535	
	5,0	hellgelb	farblos	0,506	
Milchschokolade	0,2	braun-rot	Spur gelb	0,158	0,122
	4,4	bräunlich-gelb	farblos	0,150	0,131 0,128
	0,6	bräunlich-gelb	farblos	0,150	
	1,0	gelblich	farblos	0,142	
	2,0	hellgelb	farblos	0,141	
	5,0	Spur gelb	farblos	0,134	
	7,5	farblos	farblos	0,098	
	10,0	farblos	farblos	0,063	

oxid gearbeitet wird (verschiedene Provenienz oder Lieferung). Die in der Tabelle 2 aufgeführten Theobromingehalte sind unter sich vergleichbar, sie müssen aber nicht unbedingt richtig sein, weil die Resultate bei den ungenügend geklärten Lösungen, wie bereits erwähnt, durch störende Stoffe aus dem Kakao etwas erhöht werden können. Bei höheren Zusätzen von Magnesiumoxid werden die Lösungen besser geklärt, es treten aber Verluste durch Adsorption auf. Daß es sich dabei tatsächlich um Adsorptionsverluste von Theobromin und nicht bloß um die Entfernung weiterer Mengen störender Verunreinigungen handelt, konnte eindeutig durch die UV-spektrophotometrische Differenzanalyse bewiesen werden.

Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, treten auch bei der *Carrez*-Klärung geringe Verluste auf, weil Theobromin mit anderen Stoffen zusammen am *Carrez*-Niederschlag adsorbiert wird. Aus den verschiedenen, hier aufgezählten Gründen, erwies sich die eben überprüfte Methode (Aufschluß mit Magnesiumoxid, Klärung nach *Carrez* und UV-spektrophotometrische Theobromin-Bestimmung) als wenig zuverlässig.

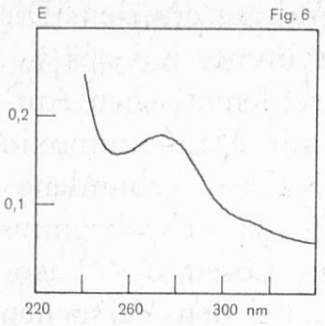
4. Mängel der Carrez-Klärung

Stark gefärbte Kakaoauszüge, wie man sie beim Kochen von Kakao oder Schokolade mit Wasser ohne Magnesiumoxid erhält, werden mit *Carrez*-Lösung nur unvollständig entfärbt. Ein beträchtlicher Teil der roten Kakaofarbstoffe bleibt in Lösung. Es wurde daher versucht, den Magnesiumoxid-Aufschluß und die *Carrez*-Klärung zu kombinieren. Um die Adsorptionsverluste niedrig zu halten, wurden relativ geringe Mengen Magnesiumoxid verwendet. Durch die Kombination der Magnesiumoxid-Behandlung mit der nachfolgenden *Carrez*-Klärung sollte es möglich sein, eine einfache Methode zur Theobromin-Bestimmung zu finden. Nach diesem Prinzip haben bereits *Englis* und *Miles* (7) gearbeitet. Die *Carrez*-Klärung erschien zunächst recht erfolgversprechend zu sein. In Modellversuchen mit reinen wässerigen Theobromin- und Coffein-Lösungen, die nach *Carrez* geklärt wurden (je 0,8 bis 1,2 ml *Carrez*-Lösung I und II auf 100 ml Endlösung) entstanden keine Alkaloid-Verluste durch Adsorption. Bei der Anwendung dieser Methode auf Milchschokolade erhielten wir jedoch unbefriedigende Ergebnisse, wie nachstehender Versuch zeigt:



Wirkung der Carrez-Klärung
a) Filtrat nach MgO-Aufschluß
b) MgO-Aufschluß und Carrez-Klärung

5 g Milchschokolade wurden zunächst mit 0,5 g Magnesiumoxid und 200 ml Wasser während 10 Minuten gekocht und filtriert, wobei man bereits ein ziemlich helles Filtrat erhielt. In zwei 100 ml-Meßkolben wurden je 10 ml des Filtrates einpipettiert und mit 1 ml 10%iger Salzsäure versetzt. Die Lösung in einem Kolben wurde anschließend mit je 1,0 ml *Carrez* I und II geklärt und auf 100 ml verdünnt. Es wurden die UV-Absorptionskurven der geklärten und ungeklärten Lösung aufgenommen (siehe Figur 5).



Differenz-Absorptionskurve
Absorptionsdifferenz zwischen den Lösungen a) und b) von Fig. 5

Die ungeklärte Lösung zeigt eine stark überhöhte Absorptionskurve. Nach der *Carrez*-Klärung war die Kurve besser, sie zeigte aber gegenüber der Kurve von Rein-Theobromin noch eine beträchtliche Überhöhung, was auf absorbierende Verunreinigungen hindeutet. Die *Carrez*-Klärung hat somit nur unvollständig gewirkt. Um zu untersuchen, ob bei der Klärung lediglich absorbierende Verunreinigungen entfernt oder ob vom *Carrez*-Niederschlag auch Theobromin zurückgehalten wurde, ermittelten wir die Differenzkurve zwischen der UV-Absorption der ungeklärten und der UV-Absorption der geklärten Lösung. Diese in Figur 6 dargestellte Differenzkurve entspricht genau der UV-Absorption der vom *Carrez*-Niederschlag zurückgehaltenen Verunreinigungen. Diese Kurve zeigt ein deutliches Absorptionsmaximum bei 272 nm, das mit größter Wahrscheinlichkeit nur von adsorbiertem Theobromin herrühren kann. Die *Carrez*-Klärung von Kakao- und Schokoladenauszügen ist also recht mangelhaft. Einerseits werden die störenden Verunreinigungen, vor allem die roten Farbstoffe, nur unvollständig entfernt, anderseits finden merkliche Verluste von Theobromin statt. Die *Carrez*-Klärung ist deshalb für zuverlässige und genaue Theobromin-Bestimmungen wenig geeignet.

5. Aufschluß ohne Magnesiumoxid

Nach der bisher benützen Arbeitsweise (Aufschluß mit Magnesiumoxid und Wasser, anschließend *Carrez*-Klärung) konnten wir durch UV-spektrophotome-

Tabelle 3 Aufschluß mit alkalischen Zusätzen

Je 1,000 g Kakaopulver wurden mit Wasser und verschiedenen Mengen Alkali gekocht. Klärung mit Bleiessig nach Abschnitt 9 «Methodik». Endvolumen = 100 ml Flüssigkeit.

Alkalizusatz	PH-Wert* vor der Pb-Fällung	Aussehen des 1. Filtrates	Aussehen des 2. Filtrates	Gefunden % Theobromin	
				Grundlinienkorrektur Faktor 2,07	$E^{max.}_{272} - E_{306}$ Faktor 1,77
0,2 g $NaHCO_3$	ca. 8	blaßgelb, klar	Spur gelb, klar	2,66	2,66
0,3 g MgO	ca. 9	Spur gelb, klar	farblos klar	2,36	2,34
0,3 g Na_2CO_3	ca. 10	Spur gelb, klar	farblos klar	2,66	2,64
—	ca. 6	blaßgelb, klar	farblos klar	2,68	2,74

* pH-Wert mit pH-Indikatorpapier bestimmt.

trische Messung z. T. gut brauchbare und reproduzierbare Resultate erzielen. Die Methode hat, wie gezeigt, verschiedene Mängel und ist nicht immer zuverlässig. Wir haben daher nach einem neuen Weg gesucht, ohne den problematischen Aufschluß mit Magnesiumoxid. Das Erhitzen der Kakaomasse mit Magnesiumoxid soll nach Literaturangaben (4) den Zweck erfüllen, das im Kakao «gebundene» Theobromin abzuspalten, wobei ein lösliches Magnesiumsalz des Theobromins entstehen soll (8). Systematische Versuche ergaben, daß zum Lösen des Theobromins gar kein Alkali oder Magnesiumoxid erforderlich ist. Bei den Versuchen in der Tabelle 3 wurden die Aufschlußbedingungen variiert. Die Aufarbeitung der Lösungen erfolgte genau nach der im Abschnitt «Methodik» angegebenen Vorschrift. Alkalische Zusätze, wie Natriumhydrogenkarbonat und Natriumkarbonat sind überflüssig. Sie erhöhen die Theobromin-Ausbeute gegenüber den Versuchen mit reinem Wasser nicht. Es werden eher etwas niedrigere Werte gefunden. Mit 0,3 g Magnesiumoxid waren bereits merkliche Verluste durch Adsorption zu beobachten.

In der Tabelle 4 sind einige Versuche mit verschieden langer Kochzeit mit Wasser ohne weitere Zusätze aufgeführt. 5 Minuten Kochzeit genügen, um das Theobromin vollständig zu lösen. Extrem lange Kochzeiten (30 Minuten am Rückflußkühler) erhöhen die Ausbeute nicht.

Tabelle 4 Einfluß der Kochzeit

Je 1,000 g Kakaopulver wurde mit 96 ml Wasser während verschiedener Zeiten gekocht. Klärung mit Bleiessig nach Abschnitt 9 «Methodik». Endvolumen = 100 ml Flüssigkeit.

Kochzeit in Min.	pH-Wert vor der Pb-Fällung	Aussehen des 1. Filtrates	Aussehen des 2. Filtrates	Gefunden % Theobromin	
				Grundlinienkorrektur Faktor 2,07	$E_{272}^{max.} - E_{306}$ Faktor 1,77
1	ca. 6	blaßgelb, klar	Spur gelb, klar	2,70	2,70
5	ca. 6	blaßgelb, klar	Spur gelb, klar	2,68	2,70
10	ca. 6	blaßgelb, Spur trübe	Spur gelb, klar	2,68	2,68
30	ca. 6	blaßgelb, Spur trübe	Spur gelb, klar	2,66	2,69

Berechnung. Die korrigierte Extinktion multipliziert mit dem entsprechenden Faktor gibt den Theobromingehalt in mg/100 ml Endlösung.

6. Klärung mit Bleiessig

An Stelle der mangelhaften *Carrez*-Klärung haben wir Versuche mit anderen Klärmitteln angestellt. Die Klärung nach *Somogiy* (9) mit Bariumhydroxid- und

Zinksulfatlösung sowie die Klärung mit Phosphorwolframsäure erwiesen sich als ungeeignet, weil die Lösungen nur ungenügend entfärbt wurden.

Im basischen Bleiacetat (Bleiessig) wurde ein nahezu ideales Klärmittel gefunden. Die Kakao-Lösungen werden vollständig entfärbt und sind gut filtrierbar. Theobromin-Verluste durch Adsorption treten nicht auf, was einigermaßen erstaunlich ist, da bei der Bleiessigklärung, wie längst bekannt, beträchtliche Mengen Zucker adsorptiv vom Niederschlag zurückgehalten werden (10). Nach der Klärung muß allerdings der Bleiüberschuß aus der Lösung entfernt werden, weil Bleiionen die UV-Absorptionsbande des Theobromins stark beeinflussen und quantitative Bestimmungen verunmöglichen. Das Blei kann durch Zusatz von Natrium- oder Kaliumorthophosphat, besser jedoch mit Natriumhydrogenkarbonat aus der Lösung entfernt werden. Es wird quantitativ als basisches Karbonat gefällt und läßt sich leicht abfiltrieren. Es wurde versucht, die Methode weiter zu vereinfachen, indem zuerst die trübe, wässerige Suspension des Kakaos oder der Schokolade mit Bleiessig versetzt, gut umgeschüttelt und dann zur Entfernung der überschüssigen Bleiionen sogleich Natriumhydrogenkarbonat zugesetzt wurde. Auf diese Weise käme man mit nur einer Filtration aus. Die Methode versagte jedoch, weil der Kläreffekt ungenügend war. Um die Gerbstoffe und die roten Kakaofarbstoffe vollständig auszufällen, muß die Lösung vor dem Filtrieren einen beträchtlichen Überschuß an Bleiessig enthalten. Das überschüssige Blei darf erst nach dem Abfiltrieren des Niederschlags mit den unlöslichen Stoffen des Kakaos entfernt werden.

Um zu prüfen, ob die Alkaloide Theobromin und Coffein durch die Behandlung mit Bleiessig nicht verändert oder vom basischen Bleiniederschlag adsorbiert werden, waren mehrere Serien von Modellversuchen nötig.

a) Einfluß von Bleiacetat auf reine Alkaloid-Lösungen

Je 50 ml einer Stammlösung, die 20 mg Theobromin oder Coffein enthielt, wurden mit steigenden Mengen (0, 5, 10 und 15 ml) bas. Bleiacetat-Lösung nach D.A.B. 6 (Bleiessig) versetzt und während 5 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit Wasser auf 100 ml verdünnt. Dabei entstand nur eine schwache Trübung. Zur Entfernung des Bleis wurden je nach Bleiessigzusatz 1 bis 3 g pulverisiertes Natriumhydrogenkarbonat zugesetzt, gut umgeschüttelt und filtriert. Von jedem Filtrat wurden 5 ml in einen 100 ml-Meßkolben abpipettiert, mit 3 ml 10 %iger Salzsäure angesäuert und zur Marke aufgefüllt. Von jeder Lösung wurde die UV-Absorptionskurve aufgenommen.

Die UV-Absorptionskurven waren für alle Lösungen nahezu identisch. Hieraus folgt, daß durch die Behandlung mit mehr oder weniger Bleiessig die Alkaloide nicht nachweisbar verändert werden. Auch die in der Endlösung nach der Entfernung des Bleis noch enthaltenen Natrium-, Acetat- und Chlorid-Ionen stören nicht.

b) Klärversuche mit Bleiessig an Kakao

In einer weiteren Versuchsreihe mit Kakao haben wir die Lösung mit steigenden Mengen Bleiessig geklärt und im Filtrat das Theobromin bestimmt.

Je 1,00 g Kakaopulver wurde mit 85—98 ml Wasser versetzt, zum Sieden erhitzt, dann 2 bis 15 ml Bleiessiglösung zugesetzt und während 5 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit Wasser ergänzt bis die Flüssigkeitsmenge genau 100 ml betrug und filtriert. In den Filtraten wurde der Bleiüberschuß durch Zusatz von 0,5—3,0 g Natriumhydrogenkarbonat ausgefällt und erneut filtriert. Von diesen vollständig farblosen und bleifreien Filtraten wurden je 3,0 ml (entsprechend 0,030 g Kakao) abpipettiert, mit 3 ml 10 %iger Salzsäure angesäuert und im Meßkolben auf 100 ml verdünnt. Von jeder der 4 Lösungen wurde das UV-Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Alle 4 Kurven verliefen praktisch identisch.

Aus den Resultaten in Tabelle 5 ist ersichtlich, daß die gefundenen Theobromin-Gehalte durchwegs gut übereinstimmten. Da mit kleinen und großen Mengen Bleiacetat das gleiche Resultat gefunden wird, ist der Beweis erbracht, daß durch die Klärung mit Bleiessig keine Theobromin-Verluste entstehen.

Tabelle 5 Klärversuche mit Bleiessig an Kakao

Versuch Nr.	Zugesetzte Wassermenge ml	Bleiessigzusatz ml	$NaHCO_3$-Zusatz g	pH-Wert der Endlösung	Abgelesene Extinktionen			Theobromin %
					$E_{272}^{max.}$	$E_{242}^{min.}$	E_{306}	
1	98	2	0,5	1,1	0,483	0,097	0,029	2,68
2	95	5	1,0	—	0,482	0,090	0,018	2,74
3	90	10	2,0	1,25	0,474	0,089	0,020	2,68
4	85	15	3,0	1,4	0,480	0,090	0,020	2,72

c) Klärversuche mit Bleiessig an Modell-Mischungen von Kakao und Magermilchpulver

In Milchschokoladen sind beträchtliche Mengen Milcheiweiß und Milchzucker vorhanden. Um abzuklären, ob die Methode auch bei Gegenwart dieser Milchbestandteile richtige Werte liefert, wurden einige Modellversuche mit je 0,500 g Kakao und 2,5 g Magermilchpulver angesetzt. Die Klärung wurde zunächst genau gleich durchgeführt wie bei den unter b) beschriebenen Versuchen, d. h., die Lösung wurde nach dem Zusatz der Bleiacetatlösung noch während 5 Minuten gekocht, dann filtriert und der Bleiüberschuß entfernt. Bei höheren Mengen an Klärmittel (10 oder 15 ml Bleiessig) erhielten wir gelb gefärbte Filtrate. Die Absorptionskurven der entsprechend verdünnten und angesäuerten Lösungen (5 ml Filtrat auf 100 ml) wurden durch die absorbierenden gelben Verbindungen stark überhöht und verfälscht. Die Theobromingehalte fielen durchwegs etwas zu hoch aus. Die mit 15 ml Bleiessig geklärte Lösung lieferte ein unbrauchbares Resultat (siehe Tabelle 6). Vermutlich entstehen beim Kochen mit Bleiessig aus dem Milchzucker und den Milchproteinen gelb gefärbte Verbindungen, die in Lösung bleiben und störend wirken.

In einer weiteren Serie haben wir das Gemisch, bestehend aus 0,5 g Kakao und 2,5 g Magermilchpulver zunächst mit Wasser während 5 Minuten gekocht, dann erst mit Bleiessig tropfenweise versetzt, sofort abgekühlt und filtriert. Diese Filtrate waren nur schwach gelblich gefärbt. Nach dem Entfernen des Bleiüberschusses blieb das Filtrat des Versuchs Nr. 1 (mit nur 2 ml Bleiessig) deutlich gelb. Hier war die Bleiessigmenge zur vollständigen Klärung nicht ausreichend. Die gefärbten Verunreinigungen aus dem Kakao sind nicht vollständig ausgefällt worden. Die UV-Absorptionskurve der entsprechend verdünnten Lösung war deutlich überhöht. Die 3 anderen Versuche mit 5, 10 und 15 ml Klärmittel lieferten vollständig farblose Filtrate. Die aus der korrigierten Extinktion berechneten Theobromingehalte stimmten in allen 4 Versuchen gut überein und entsprachen auch dem theoretischen Wert, 0,467 %, wie er sich aus dem Kakaoanteil der Mischung ($^1/_6$) und dem Theobromingehalt des Kakaos (2,80 %) errechnet.

Tabelle 6 Klärversuche an Modellmischungen

0,5 g Kakao + 2,5 g Magermilchpulver. Theobromin theoretisch $= {}^1/_6 \cdot 2{,}80 = 0{,}467$ %.

Versuch Nr.	Bleiessig-Zusatz ml	Lösung nach dem Zusatz von Bleiessig 5 Min. gekocht				Lösung nach dem Zusatz von Bleiessig sofort abgekühlt			
		Farbe des Filtrates	$E_{272}^{max.}$	E_{306}	Gefunden Theobromin %	Farbe des Filtrates	$E_{272}^{max.}$	E_{306}	Gefunden Theobromin %
1	2	farblos	0,280	0,013	0,525	gelblich	0,261	0,021	0,472
2	5	farblos	0,273	0,017	0,505	farblos	0,250	0,010	0,472
3	10	gelblich	0,371	0,049	0,635	farblos	0,258	0,015	0,477
4	15	gelbbraun	0,681	0,102	1,02	farblos	0,259	0,019	0,472

Aus den Versuchen in Tabelle 6 folgt, daß die Lösung nach dem Bleiessigzusatz nicht mehr gekocht werden darf. Die Bleiessigmenge ist so zu bemessen, daß sie für die Klärung ausreicht, d. h. im Filtrat müssen noch Bleiionen vorhanden sein (4—5 ml Klärmittel dürften optimal sein). Ein all zu großer Bleiüberschuß ist zu vermeiden, damit nicht zu viel Fremdionen in die Lösung gelangen. Das geklärte und entbleite Filtrat gehorcht übrigens streng dem *Lambert-Beerschen* Gesetz. Werden steigende Mengen (2 bis 10 ml) des Filtrates auf je 100 ml verdünnt, findet man stets den gleichen Theobromin-Gehalt, bezogen auf das Ausgangsmaterial. Die Verdünnung ist so zu wählen, daß die Extinktion des Absorptionsmaximums in den optimalen Meßbereich des UV-Spektralphotometers kommt.

d) Einfluß von Fremdionen auf die Absorptionskurve

Durch Fremdionen wird die UV-Absorptionskurve des Theobromins verändert. *Miles* und *Englis* (11) haben gezeigt, daß in 0,1-n Salzsäure das Theobromin bei

273 nm ein Maximum, bei 240 nm ein Minimum aufweist. In 0,1-n Natronlauge wird das Absorptionsmaximum des Theobromins nur minim verändert, während die Absorption im Bereich 220—254 nm stark zunimmt. Wir haben ausschließlich in saurer Lösung gearbeitet. Bei eigenen Versuchen mit reinen wässerigen Theobrominlösungen beobachteten wir mit zunehmender Salzsäure-Konzentration eine minime Erniedrigung des Absorptionsmaximums und ein starkes Ansteigen des Minimums (siehe Tabelle 7). Ähnliche Resultate ergeben sich, wenn statt mit Salzsäure mit 10 %iger Essigsäure angesäuert wird, obschon der pH-Wert viel höher lag (pH = 3—4). Hieraus folgt, daß es nicht in erster Linie das pH, sondern die Fremdionenkonzentration ist, welche die Theobromin-Absorptionskurve im Minimum beeinflußt.

Tabelle 7

Einfluß der HCl-Konzentration auf die UV-Absorptionskurve von Theobromin

Charakteristische Punkte der UV-Absorptionskurve von 1,0 mg Theobromin in 100 ml Lösung.

ml HCl 10 % in 100 ml Meßlösung	Normalität der Meßlösung	pH-Wert der Meßlösung	Abgelesener Extinktionswert		
			$E_{272}^{max.}$	$E_{242}^{min.}$	E_{306}
0	0	5,8	0,570	0,136	0
1,0	0,03	1,5	0,560	0,140	0
5,0	0,14	1,0	0,556	0,160	0,001
10,0	0,27	0,8	0,549	0,184	0,003

Nach unserer endgültigen Arbeitsvorschrift wird nach der Klärung mit Bleiessig das überschüssige Blei mit Natriumhydrogenkarbonat gefällt und das bleifreie Filtrat mit Salzsäure angesäuert. Die Lösung enthält schließlich folgende Ionen: Natrium-, Acetat-, Chlorid- und Wasserstoffionen.

Aus diesen Versuchen folgt, daß die Konzentration an Fremdionen möglichst niedrig sein soll. Dies wird erreicht durch Vermeiden eines zu großen Überschusses an Bleiessig bei der Klärung. Zur Entfernung der Bleiionen im Filtrat soll nicht zu viel Natriumhydrogenkarbonat zugesetzt und schließlich soll in der Endlösung ein größerer Salzsäure-Überschuß vermieden werden. In der endgültigen Arbeitsvorschrift sind alle diese Punkte berücksichtigt worden.

In der Tabelle 8 sind noch einige Modellversuche mit Kakao aufgeführt. Nach der Klärung mit Bleiessig und der Entfernung des Bleiüberschusses wurde das Filtrat weiter verdünnt und mit wechselnden Mengen Salzsäure oder Essigsäure angesäuert. Durch Salzsäure-Konzentrationen zwischen 0,07-n und 0,14-n wird die Extinktion im Absorptionsmaximum nicht merklich verändert. Im Absorptionsminimum wird die Extinktion mit steigender Säurekonzentration deutlich gehoben. Noch ausgeprägter ist die Wirkung der Essigsäure. Wegen der Verschie-

bung im Absorptionsminimum führt die Untergrundkorrektur nach dem Grundlinienverfahren zu unzuverlässigen Werten. Die rechnerische Korrektur aus der Differenz $E_{272}^{max.} - E_{306}$ liefert bei sämtlichen angewandten Säurekonzentrationen recht gut übereinstimmende Resultate, wie aus den Werten der letzten Kolonne in Tabelle 8 ersichtlich ist.

Tabelle 8

Einfluß der Salzsäure- und Essigsäurekonzentration auf die UV-Absorptionskurve von Theobromin

1,000 g Kakaopulver wurden nach Vorschrift, wie in der Methodik beschrieben, aufgeschlossen. 3,0 ml des mit Bleiessig geklärten und vom Bleiüberschuß befreiten Filtrates wurden mit verschiedenen Mengen Salzsäure oder Essigsäure versetzt, auf 100 ml verdünnt und ausgemessen.

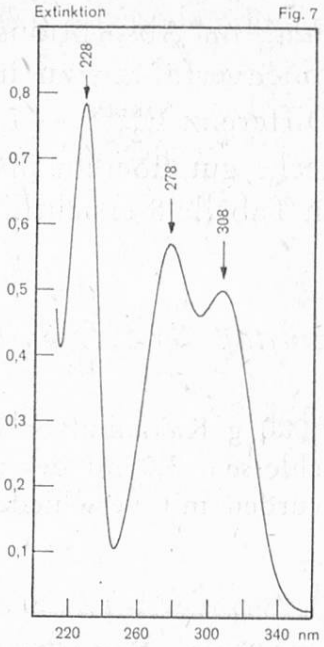
ml Säure 10 % in der Meßlösung	Normalität der Meßlösung	pH-Wert der Meßlösung	Abgelesene Extinktionen			Theobromin $1{,}77 \cdot (E_{272}^{max.} - E_{306})$ %
			$E_{272}^{max.}$	$E_{242}^{min.}$	E_{306}	
Salzsäure						
0	0	8,2	0,472	0,089	0,019	2,67
0,25	0,07	2,3	0,480	0,084	0,019	2,72
0,50	0,014	1,9	0,480	0,085	0,020	2,72
1,0	0,027	1,7	0,490	0,100	0,028	2,72
5,0	0,14	1,5	0,485	0,099	0,027	2,70
Essigsäure						
0	0	8,2	0,472	0,089	0,019	2,67
0,25	0,004	5,2	0,463	0,135	0,019	2,62
0,50	0,008	4,5	0,463	0,135	0,018	2,62
1,0	0,017	4,1	0,465	0,139	0,018	2,64
5,0	0,083	3,4	0,465	0,151	0,018	2,64

e) Störende Wirkung von Vanillin

Kakao und Schokoladen werden gelegentlich leicht vanilliert. Vanillin zeigt im UV drei deutlich ausgebildete Absorptionsbanden mit Maxima bei 228, 278 und 308 nm (siehe Figur 7). Modellversuche ergaben, daß Vanillin bei der Klärung mit Bleiessig nicht entfernt wird. Wir haben versucht, das Vanillin durch Zusatz von Eisenchlorid zu entfernen. Vanillin bildet bekanntlich mit Eisenchlorid eine intensiv blau gefärbte Verbindung. Nachdem 1 g des mit 1 % Vanillin versetzten Kakaos mit Wasser gekocht worden war, fügten wir 0,5 bzw. 5,0 ml 10 %ige Eisenchloridlösung zu, worauf sich das Reaktionsgemisch tintigschwarz färbte. Anschließend wurde, wie üblich, mit Bleiessig geklärt. Nach der Entfernung des Bleiüberschusses mit Natriumhydrogenkarbonat enthielt die End-

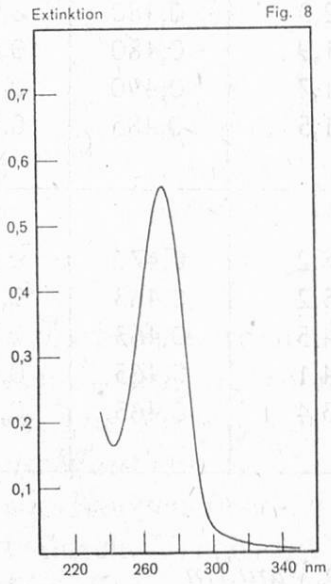
lösung noch nahezu das gesamte Vanillin. Durch Fällungs- oder Klärungsoperationen läßt sich anscheinend das Vanillin nicht entfernen. Auch der Versuch, das Vanillin in der Endlösung durch Zusatz von Eisenchlorid zu maskieren, führte nicht zum Erfolg. Die Absorptionsbanden des Vanillins im UV werden durch Eisenchlorid nicht merklich beeinflußt. Zudem absorbiert Eisenchlorid selbst in sehr verdünnter Lösung bei 272 nm bereits ziemlich stark.

Um zu prüfen, wie stark die Resultate bei Gegenwart von Vanillin verfälscht werden, haben wir zu einem Kakao bzw. Kakaomasse 1 % Vanillin zugesetzt und die Theobromin-Bestimmung genau nach der am Schluß dieser Arbeit beschriebenen Methode durchgeführt. In der Figur 8 ist die UV-Absorptionskurve der reinen Kakaomasse und in Figur 9 diejenige der gleichen Kakaomasse mit Zusatz von 1 % Vanillin dargestellt. Durch den Vanillinzusatz wird die Absorptionskurve des Theobromins stark überhöht.

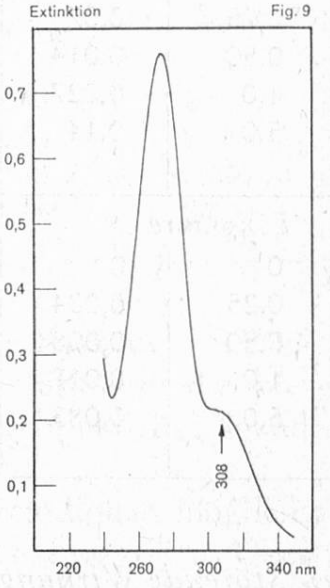


UV-Absorptionskurve von Vanillin
0,8 mg Vanillin + 0,5 ml HCl 10 % in 100 ml Lösung

Daß die Störung durch eine Überlagerung der Vanillinbanden verursacht wird, erkennt man im Verlauf der Absorptionskurve in Figur 9. Im längerwelligen UV oberhalb 300 nm ist ein schwaches Maximum angedeutet, das von der Vanillinbande bei 308 nm herrührt. Bei der graphischen Auswertung nach dem Grundlinienverfahren findet man bei Anwesenheit von Vanillin viel zu hohe Theobromingehalte, weil die beiden Vanillinbanden bei 278 und 308 nm stark stören. Der relative Fehler liegt in der Größenordnung von 10 bis 15 %. Viel bessere Werte erhält man mit der rechnerischen Korrektur $E_{272}^{max.} - E_{306}$. Zufälligerweise ist die Absorption des Vanillins bei 272 und bei 306 nm fast gleich, so daß bei dieser Art der Korrektur der Vanillinfehler praktisch eliminiert wird, wie aus den Resultaten in Tabelle 9 hervorgeht. Durch einen Zusatz von 1 % Vanillin zum Kakao wurde der Theobromingehalt nur um 0,6 % bzw. 2,6 % relativ erhöht. Dieser Fehler liegt innerhalb der normalen Versuchsstreuung. Kakao und Scho-



UV-Absorptionskurve der Alkaloid-Lösung von Kakao



UV-Absorptionskurve der Alkaloid-Lösung von Kakao mit Vanillin
(Kakao mit 1 % Vanillin)

koladen werden in der Regel nur sehr schwach vanilliert. Der Vanillin-Gehalt bewegt sich zwischen 0,04 und 0,15 %. Diese niedrigen Werte sind praktisch ohne Einfluß auf die Theobromin-Bestimmung.

Tabelle 9 Eliminierung der störenden Wirkung des Vanillins

	Kakaopulver mit 13,5 % Fett		Kakaomasse mit 55 % Fett	
	Kakaopulver rein	Kakaopulver + 1 % Vanillin	Kakaomasse rein	Kakaomasse + 1 % Vanillin
Korrektur nach dem Grundlinienverfahren				
$E_{272}^{max.}$	0,878	0,995	0,560	0,760
E_B	0,209	0,250	0,098	0,226
Differenz	0,669	0,745	0,462	0,534
% Theobromin (F = 2,07)	2,77	3,08	1,60	1,84
Abweichung, verursacht durch Vanillin	—	+ 0,31	—	+ 0,24
relativer Fehler	—	+ 11,2 %	—	+ 15,0 %
Rechnerische Korrektur				
$E_{272}^{max.}$	0,878	0,995	0,560	0,760
E_{306}	0,082	0,194	0,026	0,212
Differenz	0,796	0,801	0,534	0,548
% Theobromin (F = 1,77)	2,82	2,84	1,57	1,62
Abweichung, verursacht durch Vanillin	—	+ 0,02	—	+ 0,05
relativer Fehler	—	+ 0,7 %	—	+ 3,2 %

7. Vergleichende Alkaloid-Bestimmungen an kakaohaltigen Produkten

Nachdem die Versuchsbedingungen ausgearbeitet waren, haben wir nach der in Abschnitt 9 beschriebenen Methodik in verschiedenen Kakaomassen, Kakao, Schokoladen, Nährmitteln und anderen Produkten den Gesamtalkaloid-Gehalt ermittelt. Bei jedem Produkt haben 2 oder 3 Analytiker unabhängig voneinander und gelegentlich in Abständen von mehreren Wochen die Analysen ausgeführt. Die Berechnungen erfolgten nach den automatisch aufgezeichneten UV-Absorptionskurven. Wie aus der Tabelle 10 ersichtlich ist, sind die Resultate durchwegs gut reproduzierbar. Zum Vergleich wurden die Theobromin-Bestimmungen auch nach der Perforationsmethode (3) ausgeführt. Diese Methode liefert in der Regel um 6—10 % relativ zu niedrige Resultate, was auf Adsorptionsverluste beim Kochen mit Magnesiumoxid zurückzuführen ist.

In 2 Pudding-Pulvern, die wir nach eigenen Rezepten zusammengestellt hatten, wurde der theoretische Alkaloid-Gehalt aus der Rezeptur und dem Gesamtalkaloid-Gehalt des verarbeiteten Kakaos berechnet. Die nach der neuen Methode ermittelten Werte stimmen sehr gut mit den theoretischen Werten überein (siehe Tabelle 11). Bei einigen Schokoladen ist uns vom Hersteller die genaue Rezeptur bekannt gegeben worden. Da wir auch eine Probe der jeweils verarbeiteten Kakaomasse analysiert haben, läßt sich der zu erwartende Gesamtalkaloid-Gehalt im Endprodukt berechnen und mit dem nach der neuen Methode analytisch ermittelten Wert vergleichen. Bei einer dunklen, milchfreien Schokolade war der experimentell gefundene Gesamtalkaloid-Gehalt um 0,02 % (bzw. 4 % relativ) höher als der theoretisch berechnete Wert. Bei Milchschokoladen und kakaohaltiger Haselnußmasse wurden ebenfalls um 0,03 bzw. 0,04 % höhere Werte gefunden. Weil der Gesamtalkaloid-Gehalt bei den zuletzt genannten Produkten niedrig ist (0,15 % bzw. 0,18 %) wird der relative Fehler recht groß. Diese beträchtlichen Unterschiede sind möglicherweise darauf zurückzuführen, daß in die Schokoladen neben Kakaomasse auch noch Kakaobutter mitverarbeitet wird. Mit Preßkakaobutter gelangen geringe Mengen Alkaloide in die Schokolade. Kakaobutter enthält nach eigenen Untersuchungen 0,02 bis 0,076 % Gesamtalkaloid.

Tabelle 10 Gesamtalkaloid-Bestimmungen an Kakaoerzeugnissen des Handels

Nr.	Bezeichnung	UV-spektrophotometrisch		Zum Vergleich Perforationsmethode
		Ursprüngliche Einwaage für 100 ml Endlösung in g	Gesamtalkaloid berechnet als Theobromin %	Gesamtalkaloid berechnet als Theobromin %
1.	Italienisches Kakaopulver	0,05	2,82	2,58
		0,05	2,84	2,56
		0,03	2,76	
		0,03	2,80	
2.	Kakaomasse	0,05	1,52	1,40
		0,05	1,51	1,39
		0,05	1,58	1,41
				1,40
3.	Kakaomasse	0,03	1,52	1,42
		0,05	1,56	1,37
		0,06	1,57	
4.	Kakaokernbruch «Arriba»	0,05	1,46	1,37
		0,05	1,49	1,38
5.	Kakaokernbruch-Mischung	0,05	1,52	1,41
		0,05	1,45	1,40
		0,03	1,48	1,41

6.	Milchfreie Schokolade	0,30	0,560	0,513
		0,15	0,560	0,526
		0,15	0,561	
7.	Milchfreie Schokolade	0,15	0,819	0,77
		0,15	0,822	0,77
8.	Milchfreie Schokolade	0,09	1,10	1,10
		0,05	1,08	1,08
9.	Milchschokolade	0,30	0,153	0,122
		0,30	0,146	0,131
		0,30	0,156	0,128
		0,60	0,157	
10.	Gianduja-Mischung	0,30	0,268	0,248
		0,30	0,274	0,248
		0,30	0,268	
11.	Praliné-Mischung	0,30	0,278	0,255
		0,15	0,278	0,256
		0,30	0,282	
		0,30	0,278	
12.	Kakaohaltige Haselnußmasse	0,30	0,183	0,145
		0,30	0,184	0,141
13.	Kraftnährmittel O	0,15	0,534	—
		0,15	0,560	
14.	Kraftnährmittel D	0,15	0,415	—
		0,15	0,415	
15.	Kraftnährmittel B	0,15	0,805	—
		0,15	0,816	
16.	Kraftnährmittel S	0,05	1,07	—
		0,05	1,07	
		0,05	1,08	
17.	Kakaocrème, holländisch	0,15	0,472	—
		0,15	0,472	
18.	Glace-Pulver K (Schokolade)	0,30	0,283	—
		0,30	0,283	
		0,30	0,282	
19.	Glace-Pulver Oe (Schokolade)	0,30	0,260	—
		0,30	0,259	
20.	Puddingpulver (Schokolade)	0,15	0,411	—
		0,15	0,412	
		0,15	0,405	

Tabelle 11 Theobromin-Bestimmung in Präparaten bekannter Zusammensetzung

Zusammensetzung	Gesamtalkaloid-Gehalt berechnet als Theobromin	
	Theoretisch berechnet %	UV-spektrophotometrisch gefunden %
1. *Flan-Dessert-Pulver Chocolat*		
14,7 % Kakao mit 2,80 % Theobromin		0,411
70 % Zucker, ferner	0,411	0,412
Agar-Agar, Stärke, Vanillin		0,405
2. *Kaltpuddingpulver Chocolat*		
17,0 % Kakao mit 2,80 % Theobromin		
72,0 % Zucker, ferner	0,476	0,484
Quellstärke, Phosphate		0,455
3. *Kakao-Milchpulvermischung* (aus Tabelle 6)		
16,67 % Kakao mit 2,80 % Theobromin	0,467	0,472
83,33 % Magermilchpulver		0,472
		0,477
		0,472
4. *Milchfreie Schokolade*		
36,35 % Kakaomasse mit 1,48 % Theobromin	0,538	0,560
12 % Kakaobutter, ca. 51 % Saccharose		0,560
		0,561
5. *Milchschokolade*		
8,3 % Kakaomasse mit 1,54 % Theobromin	0,128	0,153
ca. 27 % Kakaobutter, ferner		0,146
Vollmilchpulver, Zucker		0,156
		0,157

8. Berechnung der fettfreien Kakaomasse

Aus dem Gesamtalkaloid-Gehalt des untersuchten Produktes läßt sich der Gehalt an fett- und wasserfreier Kakaomasse berechnen. In einer früheren Arbeit (3) wurde der mittlere Gehalt an Gesamtalkaloiden für fett- und wasserfreie Kakaomasse zu 3,2 % errechnet. Diese Werte basieren auf Analysen, die nach der Perforationsmethode ausgeführt worden sind. Die neue UV-spektrophotometrische Methode liefert im Mittel etwa um 8 % (relativ) höhere Resultate. Für die Berechnung der fett- und wasserfreien Kakaomasse muß deshalb ein höherer Mittelwert in die Formel eingesetzt werden. Als vorläufigen Mittelwert würden wir 3,5 % vorschlagen. Dieser Mittelwert müßte jedoch noch an einem größeren

Untersuchungsmaterial nachgeprüft werden. Für die Berechnung der fett- und wasserfreien Kakaomasse aus dem UV-spektrophotometrisch ermittelten Gesamtalkaloidgehalt gilt folgende Formel:

$$\text{fett- und wasserfreie Kakaomasse in \%} = \frac{\text{Gesamtalkaloid-Gehalt in \%}}{3{,}5} \cdot 100$$

Bei dieser Berechnung ist zu berücksichtigen, daß bei Schokoladen auch mit der Kakaopreßbutter geringe Mengen von Alkaloiden in das Endprodukt gelangen. In 3 Proben von Kakaobutter fanden wir folgende Gesamtalkaloid-Gehalte, berechnet als Theobromin: 0,021 %, 0,076 %, 0,073 %.

Wie wir bereits früher (3) gezeigt haben, schwankt auch der Gesamtalkaloid-Gehalt der verschiedenen Kakaomassen innerhalb ziemlich weiter natürlicher Grenzen. Die Berechnung der fettfreien Kakaomasse eines unbekannten Produktes wird somit immer mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sein, selbst wenn der Gesamtalkaloid-Gehalt des Präparates mit noch so großer Präzision ermittelt worden ist.

9. Methodik

Prinzip

Eine Probe des abgewogenen Untersuchungsmaterials wird mit einer abgemessenen Menge Wasser gekocht. Dabei gehen die Alkaloide Theobromin und Coffein in Lösung. Durch Zusatz von Bleiessig wird die Lösung geklärt. Nach dem Abkühlen ergänzt man das verdampfte Wasser und filtriert oder zentrifugiert. Das Filtrat versetzt man mit Natriumhydrogenkarbonat, um das überschüssige Blei auszufällen und filtriert nochmals. Vom klaren, bleifreien Filtrat wird ein aliquoter Teil abpipettiert, im Meßkolben angesäuert und auf 100 ml verdünnt. Aus der UV-Absorptionskurve wird unter Berücksichtigung des Untergrundes der Gesamtalkaloid-Gehalt als Theobromin berechnet.

Reagenzien

a) Bleiacetat-Lösung, basisch (Bleiessig) nach Ph.H.V. oder D.A.B. 6, Dichte 1,23. Darstellung nach Ph.H.V.:

Man mischt 3 Teile Bleiacetat kristallisiert mit 1 Teil Bleioxid und erwärmt die Mischung auf dem Wasserbad mit 1 Teil Wasser unter Umrühren, bis die Farbe weiß geworden ist. Hierauf setzt man so viel heißes Wasser zu, daß das Gesamtgewicht 14 Teile beträgt, läßt die Flüssigkeit in einem gut bedeckten Gefäß absetzen und filtriert sie alsdann unter Bedeckung des Trichters ab. Wenn nötig wird mit frisch ausgekochtem Wasser bis zum geforderten spezifischen Gewicht verdünnt.

b) Natriumhydrogencarbonat p. a., im Mörser pulverisiert.

c) Salzsäure 10 %.

Apparate

UV-Spektralphotometer, wenn möglich mit Schreiber.

Ausführung der Bestimmung

a) Aufschluß und Klärung. Von Kakaomasse und Kakaopulver wird 1 g auf der Analysenwaage abgewogen. Von dunklen Schokoladen, Milchschokoladen und Schokoladen mit anderen Zusätzen, sowie von allen übrigen kakaohaltigen Produkten wägt man 3 g ein. Die abgewogene Probe bringt man in einen 300 ml-Stehkolben oder in einen Erlenmeyerkolben, gibt einige Siedesteinchen oder etwas Bimssteingrieß zu, wägt den Kolben auf der Tarierwaage und notiert das Gewicht (siehe Bemerkung). Aus einem Meßzylinder fügt man 96 ml kaltes dest. Wasser zu und erhitzt den Kolben unter häufigem Umschwenken zum Sieden und läßt während 5 Minuten schwach kochen. Bei Schokoladen ist es zweckmäßig, zuerst nur wenig Wasser (10—20 ml) zuzusetzen, unter kräftigem Umschwenken zu erwärmen bis keine Klümpchen mehr vorhanden sind, erst dann den Rest des Wassers hinzuzufügen und 5 Minuten zu kochen. Den Kolben nimmt man von der Flamme weg und gibt sofort mittels Pipette tropfenweise und unter ständigem Umschwenken des Kolbens langsam 4 ml Bleiessig zu. Der Kolben wird abgekühlt, außen abgetrocknet und gewogen. Das verdampfte Wasser wird ergänzt bis das Gewicht der Flüssigkeit 101 g beträgt (dies entspricht 100 ml Flüssigkeit, weil 4 ml Bleiessig 5 g wiegen). Der Kolbeninhalt wird nochmals gut durchgemischt und durch ein trockenes Faltenfilter von 18 cm Durchmesser filtriert oder abzentrifugiert. Die ersten 10 ml des Filtrates sind zu verwerfen, Zu ca. 50 ml des klaren oder leicht trüben Filtrates fügt man 0,5 g festes pulv. Natriumhydrogenkarbonat und schwenkt gut um, wobei Bleikarbonat ausfällt. Man filtriert nochmals durch ein trockenes Faltenfilter, wobei die ersten 10 ml des Filtrates verworfen werden.

Bemerkung

Das Arbeiten in 100 ml-Meßkolben wäre weniger genau. Schokoladen enthalten rund 40 % wasserunlösliche Stoffe (Fett- und fettfreie Kakaomasse). Bei der Klärung mit Bleiessig werden noch zusätzlich beträchtliche Mengen unlöslicher Stoffe ausgefällt. Nach dem Auffüllen bis zur Marke enthält der Kolben nur ca. 97—99 ml Flüssigkeit. Wird die Flüssigkeit abgewogen, so werden in jedem Fall 100 ml Lösung zugesetzt. Die geringe Volumenvermehrung, die durch den im Untersuchungsmaterial enthaltenen Zucker erfolgt, kann vernachlässigt werden.

b) Verdünnung für die UV-spektrophotometrische Messung

Die geklärte, bleifreie Lösung muß vor der UV-spektrophotometrischen Messung weiter verdünnt werden, damit die Extinktion in den optimalen Meßbereich des Spektralphotometers gelangt. Die Tabelle 12 orientiert über Einwaage und zweckmäßige Verdünnung bei verschiedenen Kakaoerzeugnissen. Es werden 5 ml bzw. 10 ml des Filtrates in einen 100 ml-Meßkolben abpipettiert, mit 0,5 ml Salzsäure 10%ig versetzt, geschüttelt und mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese verdünnte Lösung (= Meßlösung) ist bereit zur UV-spektrophotometrischen Messung.

Tabelle 12 Angaben über Einwaage und Verdünnung verschiedener Produkte

Kakaoerzeugnis	Ungefährer Theobromingehalt %	Einwaage g	Vom bleifreien Filtrat werden abpipettiert und auf 100 ml verdünnt
Kakaomasse	1,5	1	5 ml
Kakaopulver	2,5—3	1	3 ml
Dunkle, milchfreie Schokolade	0,6—1,1	3	5 ml
Milchschokolade	0,1—0,2	3	10 ml
Milch-Haselnuß-Schokolade	0,1—0,2	3	10 ml
Gianduja- und Praliné-Mischungen	0,2—0,3	3	10 ml
Pudding- und Glacepulver	0,2—0,4	3	10 ml
Nährmittel	0,3—1	3	5 ml

c) UV-spektrophotometrische Messung

Weil Theobrominlösungen aus Kakao und Schokoladen immer mit Spuren von Stoffen verunreinigt sind, die im UV absorbieren, genügt es nicht, einfach die Extinktion im Absorptionsmaximum zu messen und hieraus den Theobromingehalt zu berechnen. Für die Untergrund-Korrektur benötigt man 2 Meßpunkte. Die verdünnte, angesäuerte Lösung wird in eine vorher tadellos gereinigte Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) eingefüllt. In die Vergleichsküvette kommt dest. Wasser. Nun wird am zweckmäßigsten die UV-Absorptionskurve im Bereich zwischen 240 und 320 nm mit dem Schreiber aufgezeichnet. Das Absorptionsmaximum für Theobromin (und Coffein) liegt bei 272 nm, das Minimum im kurzwelligen UV bei 240—244 nm. Falls kein Schreibgerät zur Verfügung steht, genügen folgende 2 Messungen:

Extinktion im Absorptionsmaximum (bei ca. 272 nm). Durch langsames Drehen der Wellenlängentrommel ist das effektive Absorptionsmaximum der Lösung aufzusuchen. Man notiert die Extinktion im Maximum und die zugehörige Wellenlänge, z. B. $E_{272}^{max.}$

Extinktion bei 306 nm (E_{306}).

d) Eichkurve

In jedem Laboratorium sollte mit dem vorhandenen UV-Spektralphotometer einmal eine Eichkurve mit reinem Theobromin aufgenommen werden. Sie verläuft linear. Mit dem Beckmann DB fanden wir für eine Lösung von 1 mg Theobromin in 100 ml (1 cm-Quarzküvetten) die Extinktion 0,565, woraus sich der Proportionalitätsfaktor 1,77 berechnet.

Berechnung

Durch Spuren von absorbierenden Verunreinigungen wird die UV-Absorptionskurve gegenüber reinen Theobromin-Lösungen etwas überhöht. Zur Korrek-

tur des Untergrundes subtrahiert man von der im Maximum gemessenen Extinktion $E_{272}^{max.}$ die bei 306 nm gemessene Extinktion E_{306}. Die Differenz, multipliziert mit 1,77 ergibt den Alkaloid-Gehalt in mg pro 100 ml Meßlösung. Es gilt somit folgende Formel:

Gesamtalkaloide ber. als Theobromin
in mg/100 ml Meßlösung $= 1{,}77 \cdot (E_{272}^{max.} - E_{306})$

Unter Berücksichtigung der Einwaage und der Verdünnung ergibt sich folgende Formel für den Theobromin-Gehalt des Ausgangsmaterials:

Gesamtalkaloide ber. als Theobromin
in % des Ausgangsmaterials $= \dfrac{1{,}77 \cdot (E_{272}^{max.} - E_{306})}{a \cdot v}$

es bedeuten:

$E_{272}^{max.}$ = Extinktion im Absorptionsmaximum bei ca. 272 nm.
E_{306} = Extinktion bei 306 nm.
a = Einwaage in g.
v = abpipettierte Menge Lösung für die Verdünnung in ml (meistens 5 oder 10 ml).

Zusammenfassung

1. Es wurde eine neue Methode zur UV-spektrophotometrischen Bestimmung der Gesamtalkaloide (Theobromin und Coffein) in Kakao, Schokoladen und anderen Kakaoerzeugnissen ausgearbeitet. Aus dem Gesamtalkaloid-Gehalt läßt sich die fettfreie Kakaomasse berechnen.

2. Die Aufschlußbedingungen zum Lösen des Theobromins, die Wirkung verschiedener Klärmittel sowie der Einfluß von Fremdionen auf die UV-Absorptionsbande wurden systematisch überprüft.

3. Die Methode wurde an zahlreichen Proben von Kakaomasse, Kakaopulver, Schokoladen, Nährmitteln, Glacepulvern ausprobiert. Sie liefert durchwegs sehr gut reproduzierbare Resultate.

Résumé

Description d'une nouvelle méthode de dosage (spectrophotométrie dans l'ultraviolet) des alcaloïdes totaux (théobromine et caféine) dans le cacao, le chocolat et les autres produits à base de cacao. A partir de la teneur en alcaloïdes totaux on peut calculer la teneur en pâte de cacao dégraissée.

Essayée sur de nombreux échantillons de pâtes de cacao, de poudres de cacao, de chocolats, d'aliments et de poudres pour glaces cette méthode a donné des résultats reproductibles.

Summary

Description of a new method for the determination of the total alcaloids (theobromine and caffeine), by ultraviolet spectrophotometry, in cocoa pastes, cocoas, chocolates, ice cream powders and other foodstuffs. It has been found that this method gives reproducible data.

Literatur

1. *Hadorn H.* und *Jungkunz R.:* Diese Mitt. **41**, 155 (1950).
2. *Hadorn H.* und *Jungkunz R.:* Diese Mitt. **40**, 416 (1949).
3. *Hadorn H.:* Diese Mitt. **55**, 217 (1964).
4. *Pritzker J.* und *Jungkunz R.:* Diese Mitt. **34**, 185 (1943).
5. *Hadorn H.* und *Zürcher K.:* Diese Mitt. **56**, 17 (1965).
6. *Levine J.:* Journ. Assoc. off. Agric. Chem. (AOAC) **45**, 254 (1962).
7. *Englis D. T.* und *Miles J. W.:* Analyt. Chemistry **26**, 1214 (1954). Referat in Z. anal Chem. **147**, 457 (1955).
8. *Moores R. G.* und *Campbell H. A.:* Analytic. Chemistry **20**, 40 (1949). Referat in Z. anal. Chem. **130**, 93 (1949/50).
9. *Somogyi M.:* J. Biol. Chem. **160**, 69 (1945) zitiert nach Schweiz. Lebensmittelbuch (5. Auflage) 1. Band, S. 560, Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale Bern (1964).
10. *Hadorn H.* und *Jungkunz R.:* Diese Mitt. **41**, 430 (1950).
11. *Miles J. W.* und *Englis D. T.:* J. Amer. pharmac. Assoc. sci. Edit. **43**, 589 (1945) Referat in Z. anal. Chem. **147**, 457 (1955).

Contrôle bactériologique des préparations enzymatiques en meunerie et en boulangerie

R. Lambion, R. Christiaen et *A. Veulemans*

Station d'Essais et d'Analyses du Centre d'Enseignement et de Recherches pour les Industries Alimentaires et Chimiques (C.E.R.I.A.), Bruxelles

Introduction

On attache de plus en plus d'importance à la qualité bactériologique des farines.

Ceci résulte en partie du développement important des techniques de contrôle microbiologique et de leur application dans un nombre de plus en plus grand de laboratoires qui autrefois se cantonnaient dans des contrôles chimiques, mais surtout d'une évolution, d'une part, dans les techniques de fabrication et de commercialisation et, d'autre part, dans nos connaissances quant aux risques que font courrir les micro-organismes aux consommateurs.

L'industrialisation de la production du pain pose des problèmes technologiques, non seulement au niveau de l'obtention de produits constants, mais aussi en ce qui concerne leur conservabilité, c'est-à-dire leur aptitude à rester frais pendant un temps suffisant pour leur commercialisation. Leur emballage s'imposait