

Bestimmung der 5-Hydroxytryptamide in Kaffee mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Autor(en): **Hunziker, H.R. / Miserez, A.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **68 (1977)**

Heft 2

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982231>

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.

Kurze Mitteilung — Communication brève

**Bestimmung der 5-Hydroxytryptamide in Kaffee
mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie**

H. R. Hunziker und A. Miserez
Eidg. Gesundheitsamt, Bern

Einleitung

Die in der Außenauf Lagerung grüner Kaffeebohnen befindlichen 5-Hydroxytryptamide (5-HT) haben in den letzten Jahren eine gewisse Bedeutung erlangt, da ihre Entfernung mit anderen Wachstoffen die physiologischen Eigenschaften des Kaffees modifiziert (1, 2, 3).

Bei einem eingehenden Studium des Kaffeewachses isolierten *Wurziger* und *Harms* (2) eine dünn schicht chromatographisch einheitliche Substanz I, die sich nach späteren Untersuchungen (4) als Gemisch bestehend aus Arachinsäure-5-hydroxytryptamid, Behensäure-5-hydroxytryptamid und Lignocerinsäure-5-hydroxytryptamid herausstellte. Diese Substanz I wurde von den Autoren Carbonsäure-5-hydroxytryptamide (C-5-HT) genannt. Als Derivate der 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) mit Fettsäuren werden die drei Homologe in dieser Arbeit kurz als 5-Hydroxytryptamide bezeichnet.

Die quantitative 5-HT-Bestimmung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) von *Wurziger* (2) und nach einer ähnlichen, vom Eidg. Gesundheitsamt leicht modifizierten Methode der Firma Hag, Bremen (4) beruhen auf einer Vorreinigung des Kaffee-Wachsextraktes (Säulenchromatographie) mit anschließender DC. Die mit Gibbs-Reagens (2,6-Dichlorchinonchlorimid) blau angefärbten 5-HT-Flecken werden photometrisch bestimmt.

Die relativen Fehler von $\pm 10\%$ dieser Methode veranlaßten *P. Kummer* und *E. Bürgin* (6), eine verbesserte Methode zu entwickeln. Sie stützt sich auf die oben erwähnte DC-Methode, wobei 5-HT-Flecken extrahiert und UV-spektrophotometrisch bestimmt, bzw. mit Gibbs-Reagens angefärbt und direkt ab DC-Platte densitometrisch bestimmt werden. Durch Vergleich mit Standardsubstanzen (Serotonin bzw. Substanz I) resultieren aus diesen zwei Methoden 5-HT-Bestimmungen mit relativen Standardabweichungen von 0,6 bis 6%.

Die arbeitsaufwendige Methode veranlaßte uns, eine einfachere, schnellere und genauere Bestimmungsmethode für 5-HT zu entwickeln.

Erste Versuche und Resultate in dieser Richtung werden im folgenden beschrieben und diskutiert. Untersuchungen über die Anwendung der entwickelten Methode zur Bestimmung von 5-HT (inkl. Verhältnis der Homologe) in grünem und

geröstetem Kaffee verschiedener Sorten, Provenienz und Alters sind im Gange und werden demnächst publiziert.

Experimenteller Teil

Methode

Als Trennmethode des komplexen Kaffee-Wachsextraktes wird die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie ((HPLC) herangezogen.

Die Wachsauflagerung der Kaffeebohne wird mit einem geeigneten Lösungsmittel (6) extrahiert. Nach Filtration der Extraktlösung wird die Probe auf eine Kieselgelsäule aufgegeben, wobei CHCl_3 mit 1% CH_3OH als mobile Phase eingesetzt wird. Die Detektion mittels UV-Spektrophotometer bei $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$ liefert 3 Hauptkomponenten: Kaffee-Fett (Petrollöslicher Anteil), Coffein und 5-Hydroxytryptamide (Substanz I) (s. Abbildung 1).

Die Identifizierung der Peaks erfolgt durch Vergleich der Retentionszeit. Für Coffein und Hydroxytryptamide wurde noch zusätzlich durch Fraktionierung und Messung des Massenspektrums (Probemenge ca. $1 \mu\text{g}$) diese Identifizierung bestätigt. Dauer der Chromatographie ca. 8 Minuten.

Die Trennung der Homologe der Substanz I erfolgt mittels «reverse-phase»-Chromatographie innerhalb von ca. 10 Minuten (siehe Abbildungen 2 und 3).

Reagenzien und Lösungsmittel

Chloroform	zur Analyse: über Kolonne destilliert und bei Raumtemperatur mit H_2O gesättigt
Methanol	zur Analyse, über Kolonne destilliert
H_2O	über Kolonne destilliert
Benzol	zur Analyse
Petroleumbenzin	zur Analyse Siedebereich $40\text{--}60^\circ\text{C}$
Acetonitril	zur Synthese
DC-Alufolien	Kieselgel 60 F ₂₅₄
Kieselgel 60 PF ₂₅₄	für präparative DC
Kieselgel 60	70—230 mesh für Säulenchromatographie

Geräte

HPLC-Gerät	Spectra-Physics 3500B Detektor: UV-Vis Det. Chromatronix 770 mit variabler Wellenlänge Einlaß-System: 10 μl Probeschleufe: Chromatronix HP Valve
Fertigsäulen	Kieselgel: Spherisorb 5 μ , 3 auf 250 mm ODS: Spherisorb «reverse-phase» 5 μ , 3 auf 250 mm
Massenspektrograph	GC-MS Spektrometer: Finnigan 3100D

Gewinnung reiner 5-Hydroxytryptamide (Substanz I)

100 g Kaffeewachs, wie es beim Entcoffeinierungsprozeß in großen Mengen anfällt, wird mit Petroläther in einer Soxhlet-Apparatur während 4 Tagen extrahiert. Der in Petroläther unlösliche Anteil (40 g) wird 4—5mal mit Acetonitril aufgeköcht (250 ml) und heiß filtriert. Das auskristallisierte Produkt wird zur Entfernung von Coffein 4mal mit 500 ml H₂O aufgeköcht, heiß filtriert und anschließend aus Benzol umkristallisiert. Es resultieren 2,4 g eines beigen Produktes (Smp 98—103°C), das fett- und coffeinfrei ist (Kontrolle durch HPLC), jedoch noch alle Begleittryptamide enthält.

Präparative DC: Tryptamidgemisch (40 mg) gelöst in 0,5 ml Benzol-Methanol (1:1 v/v) wird auf eine Kieselgelplatte mit 2 mm Schichtdicke aufgetragen. Fließmittel: Benzol/Methanol (22:3 v/v). Unter der UV-Lampe ist die Substanz I gut erkennbar. Dieser Substanzfleck wird herausgekratzt und mit CHCl₃/CH₃OH (1:1 v/v) eluiert.

Ausbeute 20 mg, Smp 116°C.

Da sich während der Chromatographie und bei längerem Lagern (1 Monat) Tryptamide z. T. zersetzen, müssen kurz vor der Verwendung der Tryptamide als Standardsubstanz diese durch eine Säulenchromatographie (Kieselgel) gereinigt werden. Die Tryptamidlösung wird auf die Säule gebracht und mit Chloroform eluiert (ca. 100 ml), bis im Eluat mittels HPLC keine Zersetzungsprodukte mehr festzustellen sind (schmaler Peak mit Retentionszeit wie Totzeit der Kolonne). Die am Start zurückgebliebenen Tryptamide werden mit Methanol eluiert. Das Methanol wird abgedampft und der Rückstand in der mobilen Phase (Methylalkohol/Wasser 95:7 v/v) gelöst. Die erhaltene Lösung des reinen Gemisches der Homologe der 5-Hydroxytryptamide wird als Standardlösung gebraucht.

HPLC-Trennung der 5-Hydroxytryptamide

Extraktion der Tryptamide (Kaffeewachsextrakt)

10 g grüne Kaffeebohnen werden nach (6) in CHCl₃-Äthanol (7:3 v/v) extrahiert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird in der entsprechenden mobilen Phase gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Vor den Probeaufgaben wird die Extraktlösung mittels Milipore-Filter filtriert.

Trennung auf Kieselgel (Abb.1)

Säule	Spherisorb 5 µ, 3 auf 250 mm
Mobile Phase	CHCl ₃ (H ₂ O-gesättigt) + 1% v/v CH ₃ OH
Volumengeschwindigkeit	1,2 ml/min
Detektor	UV 278 nm
Schreiber	1 cm/min
Einspritzmenge	10 µl Extraktlösung

Totzeit		63 sec	
Retentionszeit	Nr. 1	71,4 sec	Kaffee-Fett
	Nr. 2	166,8 sec	Coffein
	Nr. 3	226,2 sec	Tryptamide (Substanz I)
	Nr. 4	315,6 sec	Begleitstoffe (phenolische Stoffe)
Kapazitätsverhältnis		$K'_2 = 1,65$	$K'_3 = 2,59 (7)$

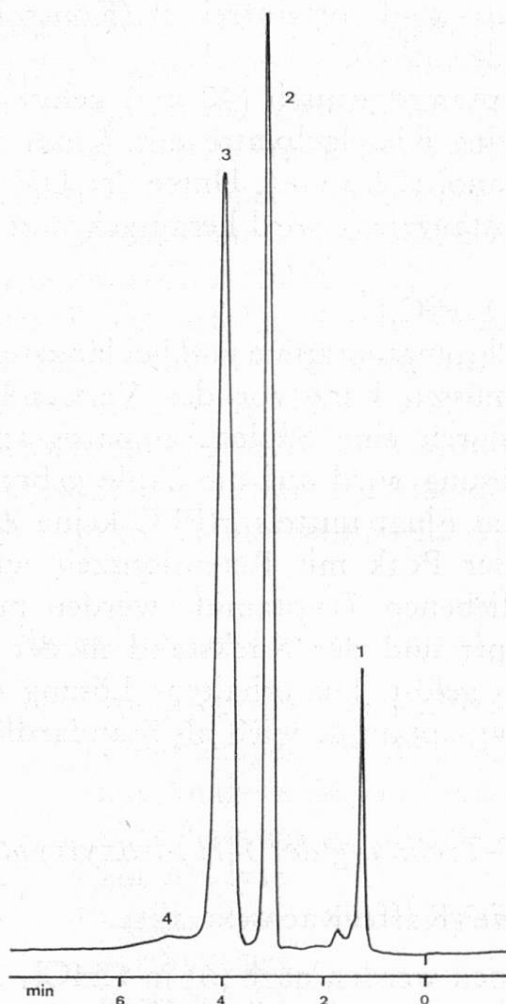


Abb. 1. Trennung der Extraktlösung auf Kieselgel

Trennung auf «reverse-phase»-säule

Säule	Spherisorb ODS 5 μ , 3 auf 250 mm
Mobile Phase	CH ₃ OH/H ₂ O, 95:7 v/v
Schreiber	1 cm/min
Detektor	UV 278 nm
Einspritzmenge	10 μ l Standard- bzw. Extraktlösung
Volumengeschwindigkeit	1,2 ml/min

— Standardlösung (Abb. 2)

Totzeit	66 sec	Peakfläche
Retentionszeit Nr. 1	246,0 sec	23,6%
Nr. 2	295,2 sec	67,8%
Nr. 3	367,8 sec	8,6%
Kapazitätsverhältnis	$K'_1 = 2,73$ $K'_2 = 3,47$ $K'_3 = 4,57$	

— Extraktlösung (Abb. 3)

Peak 1	nicht identifiziert
Peak 2	Coffein
Peak 3—5	Tryptamide entsprechend Standardlösung

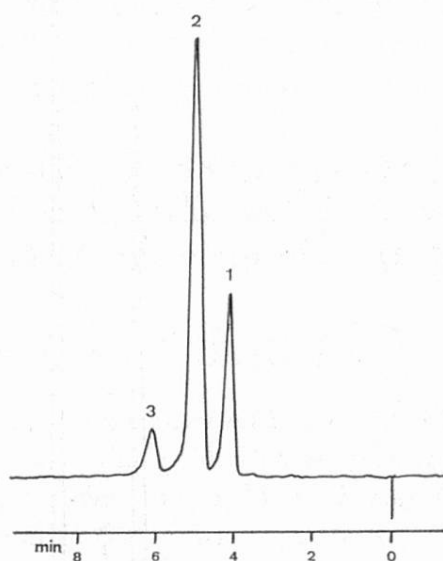


Abb. 2. HPLC-Trennung von Standardlösung

Bemerkungen

Methode

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie ist eine schnelle Trennmethode, die sich gut für die Trennung und quantitative Bestimmung der 5-Hydroxytryptamide eignet. Die einzelnen Peaks sind bis zur Basislinie getrennt, was eine quantitative Bestimmung erleichtert.

Der Kaffeewachsextrakt kann direkt nach Filtration (vgl. Extraktion der Tryptamide) auf die Kolonne aufgegeben werden. Die Chromatographie ist nach ca. 8—10 Minuten beendet. Bei der Kieselgelsäule liegt die Nachweisgrenze bei 2 mg Tryptamid (Substanz I) pro Liter. Die Peakhöhe ist im geprüften Bereich von 10 bis 120 mg/l linear (Korrelations- Koeffizient: 0,99997).

Die Trennung des Kaffeewachsextraktes auf der Kieselgelsäule wird sehr stark beeinflusst durch den Gehalt an H₂O und Methanol. Um gut reproduzierbare Retentionszeiten zu erzielen, empfiehlt es sich, größere Mengen des Lösungsmittelgemisches herzustellen.

Mit trockenem CHCl_3 sind die Retentionszeiten sehr groß, mit einem CH_3OH -Gehalt von 1,5% sind Tryptamid- und Coffein-Peaks nicht mehr bis zur Basislinie getrennt. Die Standardabweichung der Retentionszeit ist sehr klein und beträgt 0,5—1%.

Für das Sammeln einzelner Fraktionen (für Massenspektren) werden Trennbedingungen gewählt, die einen größeren K' -Wert ergeben (für die Kieselgelsäule kleinerer CH_3OH -Anteil bzw. für die ODS-Säule größerer H_2O -Anteil).

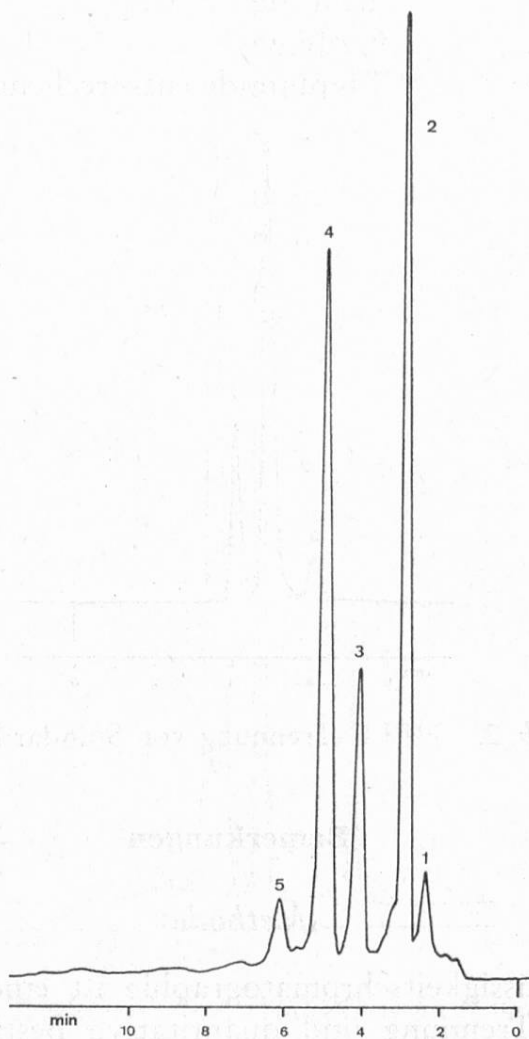


Abb. 3. HPCL-Trennung von Extraktlösung

Bei der «reverse-phase»-Säule mit $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) als mobile Phase wurde noch bei einer Beladung von 1 mg pro Spritzung eine gute Trennung der homologen Tryptamide erreicht. Die Zuordnung der Peaks aufgrund des Vergleiches der Retentionszeit wird durch Massenspektren aufgefangener Fraktionen bestätigt (Coffein: M^+ 194; Tryptamide: Basispeak 159; getrennte homologe Tryptamide: M^+ 470, bzw. 498).

Resultate

Die Trennung der homologen Tryptamide der Substanz I zeigt, daß die von Harms (4) mittels Massenspektrometrie ermittelten Mengenverhältnisse der drei homologen 5-Hydroxytryptamide andere Werte ergeben. Dies wurde an Hand des Kaffee-Wachsextraktes (Santos) bestätigt.

Da der molare Extinktions-Koeffizient der 3 homologen Tryptamide Arachinsäure-5-hydroxytryptamid (MG 470), Behensäure-5-hydroxytryptamid (MG 498) und Lignocerinsäure-5-hydroxytryptamid (MG 526) gleich sein dürfte (mittleres Molekulargewicht $498 \pm 5,6\%$), liegen diese Komponenten aufgrund der ermittelten Peakflächen-Verhältnisse bei 24:68:8% in der Substanz I bzw. im Kaffee-wachsextrakt vor.

Die Herstellung von reinem Gemisch der Homologe der Tryptamide (Substanz I) ist aufwendig, doch unumgänglich für einen Standard. Die in der Literatur (6) aufgeführten Abweichungen der Standardkurve für Tryptamide dürfte der schwierigen Isolation und der Instabilität der Hydroxytryptamide zuzuschreiben sein. In dieser Beziehung leistet die HPLC-Methode gute Dienste. Sie erlaubt Zeretzungsprodukte der Tryptamide nachzuweisen, die auf der DC-Platte nicht sichtbar sind. Somit ist die Garantie für einen sauberen Standard wesentlich besser.

Dank

Unser Dank gilt Herrn H. Zimmermann für die Ausführung der MS-Spektren sowie Frau K. Völgyi für die Mithilfe bei den praktischen Arbeiten.

An dieser Stelle danken wir der Firma HACO AG Gümligen für das uns freundlicher Weise zur Verfügung gestellte Kaffee-wachs bestens.

Zusammenfassung

5-Hydroxytryptamide aus der Cuticula grüner Kaffeebohnen werden mittels HPLC getrennt und können quantitativ bestimmt werden. Mittels «reverse-phase»-Säulen werden 3 homologe 5-Hydroxytryptamide getrennt.

Durch die geringe Probevorbereitung läßt sich eine schnelle Bestimmung erreichen.

Résumé

Les 5-hydroxytryptamides extraits de la cuticule du café vert sont séparés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et peuvent être dosés quantitativement. Sur colonnes à phase renversée («reverse-phase») trois hydroxytryptamides homologues sont séparés. La méthode est rapide.

Summary

5-hydroxytryptamides from the cuticula of green coffee-beans have been separated by HPLC with the possibility of a quantitative determination. With reverse-phase columns, three homologous 5-hydroxytryptamides can be separated.

Because of a minimal sample preparation, a rapid determination is possible.

Literatur

1. Seifert, J.: Bestehen Unterschiede in der Reaktion des Magens auf Kaffeegetränke, die aus Kaffee unterschiedlicher Aufbereitung bzw. Veredelung hergestellt sind. Diss. München 1965.
2. Wurziger, J. und Harms, U.: Beiträge zum Genußwert und zur Bekömmlichkeit von Röstkaffee. Kaffee- u. Tee-Markt **19**, 6 ff. (1969).
3. Wurziger, J.: Les éléments constitutifs nouveaux récemment découverts dans le café et leur importance pour l'appréciation des infusions de café. Ann. fals. exp. chim. **66**, 1—18 (1973).
4. Harms, U.: Beiträge zum Vorkommen und zur Bestimmung von Carbonsäure-5-hydroxytryptamide in Kaffeebohnen. Diss. Hamburg 1968.
5. Kreisschreiben Nr. 2 des Eidg. Gesundheitsamtes vom 8. Januar 1973.
6. Kummer, P. und Bürgin, E.: Neue Erkenntnisse zur quantitativen Bestimmung der Carbonsäure-5-hydroxytryptamide in Kaffee. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **67**, 212—225 (1976).
7. Engelhardt, H.: Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie HPLC. Anleitung für die chemische Laboratoriumspraxis, Band 14, Berlin Springer-Verlag, 1975.

Dr. H. R. Hunziker
Dr. A. Miserez
Eidg. Gesundheitsamt
Abteilung Lebensmittelkontrolle
Haslerstraße 16
CH-3008 Bern