Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und

Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 68 (1977)

Heft: 2

Artikel: Bestimmung der 5-Hydroxytryptamide in Kaffee mittels Hochdruck-

Flüssigkeitschromatographie

Autor: Hunziker, H.R. / Miserez, A.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982231

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 13.12.2025

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

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 Außenauflagerung grüner Kaffeebohnen befindlichen 5-Hydroxytryptamide (5-HT) haben in den letzten Jahren eine gewisse Bedeutung erlangt, da ihre Entfernung mit anderen Wachsstoffen die physiologischen Eigenschaften

des Kaffees modifiziert (1, 2, 3).

Bei einem eingehenden Studium des Kaffeewaches isolierten Wurziger und Harms (2) eine dünnschichtehromatographisch 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 ± 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 Hoch-

druck-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 CHCl₃ mit 1% CH₃OH als mobile Phase eingesetzt wird. Die Detektion mittels UV-Spektrophotometer bei $\lambda_{\rm max}=278$ 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 µg) diese Identifi-

zierung 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 H₂O gesättigt zur Analyse, über Kolonne destilliert

H₂O über Kolonne destilliert

Benzol zur Analyse

Petroleumbenzin zur Analyse Siedebereich 40-60°C

Acetonitril zur Synthese DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ Kieselgel 60 PF₂₅₄ 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 ul Probeschlaufe:

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

268

Methanol

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 aufgekocht (250 ml) und heiß filtriert. Das auskristallisierte Produkt wird zur Entfernung von Coffein 4mal mit 500 ml H₂O aufgekocht, 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-Aethanol (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 Mobile Phase Volumengeschwindigkeit

Detektor Schreiber

Einspritzmenge

Spherisorb 5 µ, 3 auf 250 mm

CHCl₃ (H₂O-gesättigt) + 1% v/v CH₃OH

1,2 ml/min UV 278 nm 1 cm/min

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)
Kapazitätsverh	ältnis	$K'_2 = 1,65$	$K'_3 = 2,59 (7)$

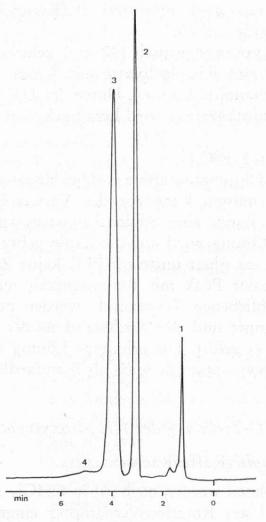


Abb. 1. Trennung der Extraktlösung auf Kieselgel

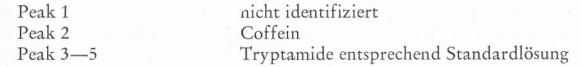
Trennung auf «reverse-phase»-säule

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 µl Standard- bzw. Extraktlösung
Volumengeschwindigkeit	1,2 ml/min

- Standardlösung (Abb. 2)

Totzeit		66	sec	Peakfl	äche
Retentionszeit Nr. 1		246,0	246,0 sec $23,6^{\circ 0/\circ}$		
	Nr. 2	295,2	sec	$67,8^{\circ}/_{\circ}$	
	Nr. 3	367,8	sec	sec $8,6^{0/0}$	
Kapazitätsverhältnis		$K'_1 =$	= 2,73	$K'_2 = 3.47$	$K'_3 = 4.57$

- Extraktlösung (Abb. 3)



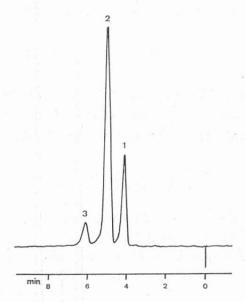


Abb. 2. HPLC-Trennung von Standardlösung

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 CHCl3 sind die Retentionszeiten sehr groß, mit einem CH3OH-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 CH3OH-Anteil bzw. für die ODS-Säule größerer H2O-Anteil).

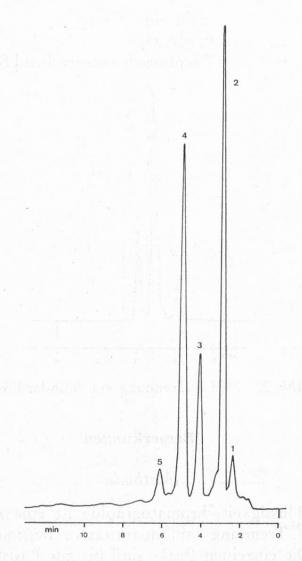


Abb. 3. HPCL-Trennung von Extraktlösung

Bei der «reverse-phase»-Säule mit CH3OH/H2O (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 Arachin-säure-5-hydroxytryptamid (MG 470), Behensäure-5-hydroxytryptamid (MG 498) und Lignocerinsäure-5-hydroxytryptamid (MG 526) gleich sein dürfte (mittleres Molekulargewicht 498 ± 5,6%), liegen diese Komponenten aufgrund der ermittelten Peakflächen-Verhältnisse bei 24:68:8% in der Substanz I bzw. im Kaffeewachsextrakt vor.

Die Herstellung von reinstem 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 Zersetzungsprodukte 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 freundlicherweise zur Verfügung gestellte Kaffeewachs 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 colums, 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-5hydroxytryptamide 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