

CHROM. 8488

## Note

---

### Trennung von Coffein, Theophyllin und Theobromin mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie

WERNER WILDANGER

*Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Technischen Universität, Wunstorfer Str. 14, D-3000 Hannover (B.R.D.)*

(Eingegangen am 15. April 1975; geänderte Fassung eingegangen am 3. Juni 1975)

Coffein (das 1,3,7-Trimethylxanthin), Theophyllin (das 1,3-Dimethylxanthin) und Theobromin (das 3,7-Dimethylxanthin) sind physiologisch stark wirksame Substanzen. Sie werden aufgrund ihrer diuretischen und belebenden Wirkung direkt oder als Derivate in der Heilkunde eingesetzt. Eine Reihe pflanzlicher Genussmittel, wie Kaffee, Tee, Kakao, enthält diese Stoffe. In einigen verbreiteten Erfrischungsgetränken setzt man Coffein bewusst zu.

In der Lebensmittelanalytik bestimmt man diese drei Xanthine meist als Summe, da sich die nasschemische Trennung für die Routineanalytik als zu aufwendig erweist<sup>1</sup>. Bisher wurde die Trennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einem Ionenaustauscher beschrieben<sup>2,3</sup>; die dürftige Trennung beider Schriften ist identisch. Theophyllin und seine Abbauprodukte wurden getrennt<sup>4,5</sup>. Coffein wurde mehrfach in pharmazeutischen Zubereitungen bestimmt<sup>6–11</sup>, wobei meist Ionenaustauscher verwandt wurden. Um eine auch in der Lebensmittelanalytik verwendbare Methode zu erhalten, war eine möglichst weite Auftrennung notwendig.

#### METHODE UND GERÄTE

Die Trennung wurde auf einem Siemens Hochdruckflüssigkeitschromatographen S 200 mit einem Zeiss/Siemens Spectralphotometer-Detektor PM4CHR und dem Hochdruckspritzeninjektionssystem durchgeführt. Die Stahl-Trennsäule war 30 cm lang und hatte einen i.D. von 3 mm. Sie war mit Kieselgel LiChrosorb SI 60, 5  $\mu\text{m}$ , nach einer bereits beschriebenen Slurry-Methode gefüllt<sup>12</sup>. Als mobile Phase diente die organische Phase der Mischung Dichlormethan-Äthanol-Wasser (1872:94:34). Es wurde bei Raumtemperatur chromatographiert. Der Vordruck betrug 120 bar, der Durchfluss 70  $\text{cm}^3 \text{h}^{-1}$ . Das Photometer war bei einer Bandbreite von 20  $\mu\text{m}$  auf 275  $\mu\text{m}$  eingestellt.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fig. 1 zeigt die Trennung der drei Reinsubstanzen, welche in der mobilen Phase gelöst wurden. Die Analyse dauert *ca.* 5 min. Fig. 2 und 3 zeigen Chromatogramme von Schokoladenextrakten, welche nach folgendem Verfahren erhalten

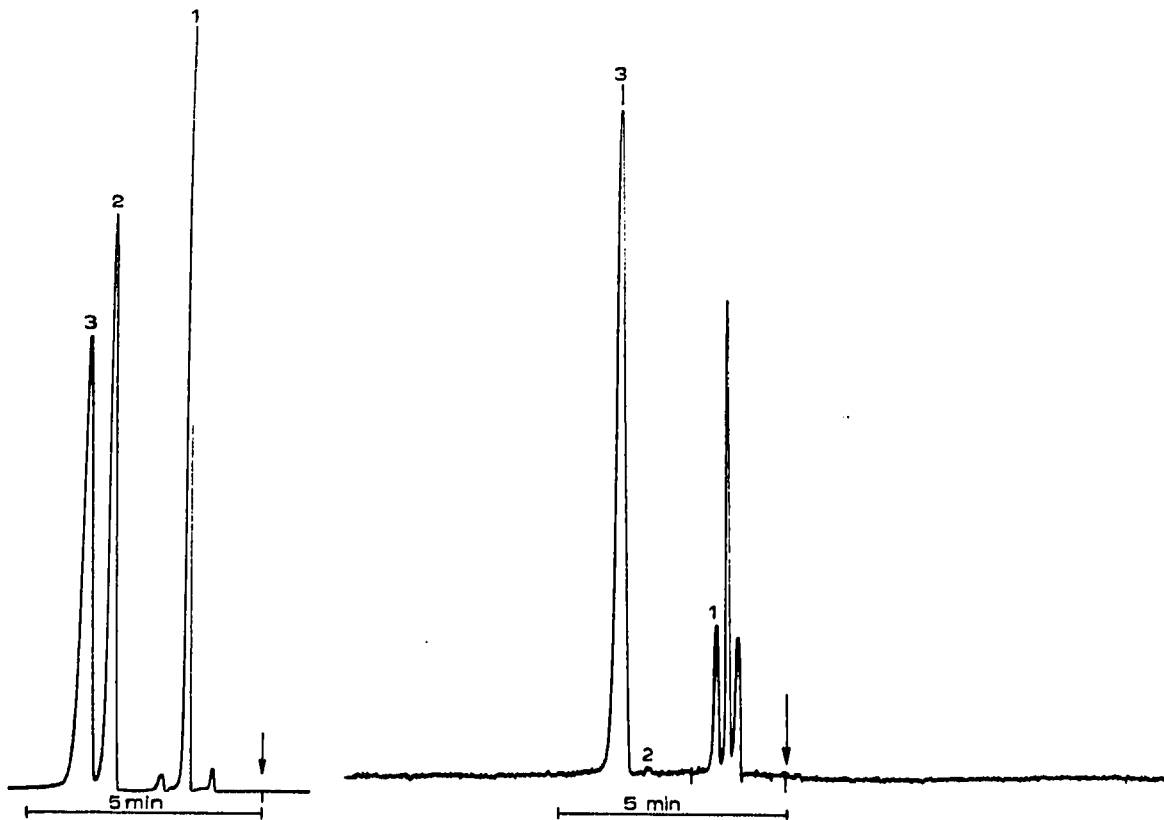


Fig. 1. Chromatogramm der Reinsubstanzen. 1 = Coffein; 2 = Theophyllin; 3 = Theobromin.

Fig. 2. Chromatogramm einer Vollmilchschokolade. 1 = Coffein; 2 = Theophyllin; 3 = Theobromin.

wurden: *ca.* 5 g Schokolade wurden mit 100 ml Eluens übergossen und *ca.* 10 min gerührt. Anschliessend wurde abfiltriert, die ersten Milliliter wegen der Trübung verworfen und vom klaren Filtrat 20 mm<sup>3</sup> zur Analyse eingespritzt. Genaue Clean-up-Vorschriften für die quantitative Bestimmung in verschiedenen Lebensmitteln werden noch von uns erarbeitet.

Fig. 2 ist das Chromatogramm einer Vollmilchschokolade, Fig. 3 das einer Moccaschokolade. Bei etwa gleich grossen Theobrominpeaks unterscheiden sich die Coffeinemengen stark. Der durch den Kaffeezusatz erhöhte Gehalt an Coffein in Relation zum Theobromin ist klar zu erkennen.

Die Trennsäule ist sehr leicht zu handhaben, da die flüssige "stationäre" Phase laufend durch Gleichgewichtseinstellung nachgebildet bzw. konstant gehalten wird. Daraus ergeben sich wesentliche Vorteile gegenüber einer früher beschriebenen Trennung der drei Xanthine<sup>13</sup>, welche auf mit Poly G-300 belegtem Corasil durchgeführt wurde. Bei stark verunreinigten Proben, wie sie in biologischen Extrakten immer vorliegen, kann die Trennsäule verschmutzt und sogar unbrauchbar werden. Das von uns verwendete System ist mit Dioxan leicht zu regenerieren; die *in-situ*-

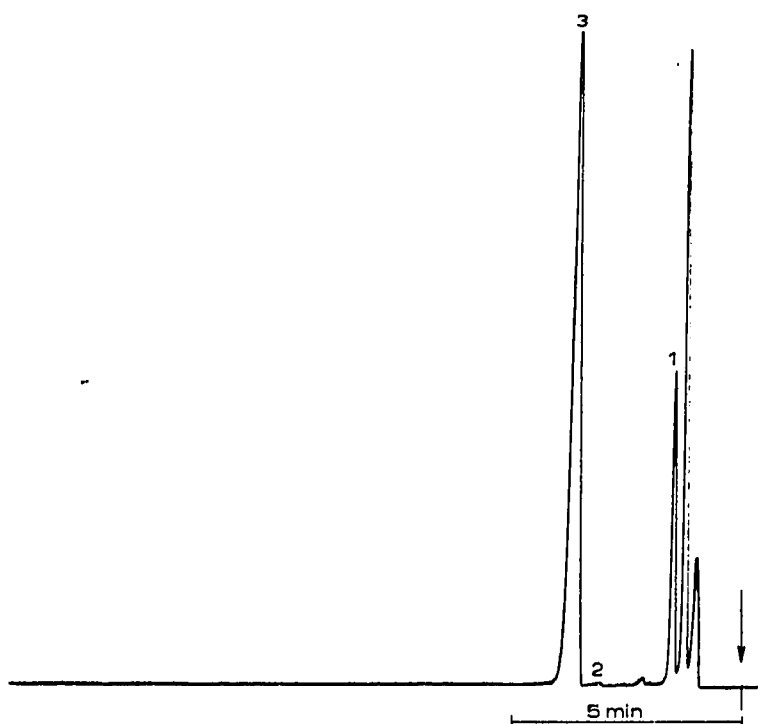


Fig. 3. Chromatogramm einer Moccaschokolade. 1 = Coffein; 2 = Theophyllin; 3 = Theobromin.

Belegung aus der mobilen Phase erfolgt durch einfaches Durchpumpen derselben. Vorsäule und Eluensättigung mit stationärer Phase entfallen. Eine Trennsäule wurde hier *ca.* zwei Monate für verunreinigte Lebensmittelextrakte benutzt; nach Dioxan-Zwischenspülungen ist sie noch immer voll verwendbar.

#### LITERATUR

- 1 K. Rauscher, R. Engst und U. Freimuth, *Untersuchung von Lebensmitteln*, VEB Fachbuchverlag, Leipzig, 1972, S. 678-680.
- 2 *Katalog 1974*, Reeve Angel, Clifton, N.J., S. 23.
- 3 *Druckschrift PB-203*, Tracor Chromatec, Austin, Texas.
- 4 R. D. Thompson, H. T. Nagasawa und J. W. Jenne, *Abstr. Pittsburgh Conf., Anal. Chem. Appl. Spectrosc., Cleveland, Ohio, 1974*, Nr. 103.
- 5 C. V. Manion, D. W. Shoeman und D. L. Azarnoff, *J. Chromatogr.*, 101 (1974) 169.
- 6 *Application of Perisorb KAT 73-8*, E. Merck, Darmstadt.
- 7 *Application of LiChrosorb SI 60 74-8*, E. Merck, Darmstadt.
- 8 *Application Sheet 1*, Pye Unicam, Cambridge.
- 9 *LC-Applications Bulletin 19*, Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.
- 10 *LC Application Lab. Report 72-04*, DuPont, Friedberg.
- 11 *Chromatographic Methods 820 M 3 und 820 M 5*, DuPont, Friedberg.
- 12 W. Wildanger, *Chromatographia*, 8 (1975) 42.
- 13 C.-Y. Wu und S. Siggia, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 1499.