

Über die Bestimmung von Purinen in coffeinhaltigen Drogen*.

Von
H. Michl und F. Haberler.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 24. März 1954.)

Mit Hilfe zum Teil neu entwickelter papierchromatographischer und papierelektrophoretischer Verfahren wird an sechs coffeinhaltigen Drogen eine qualitative und quantitative Purinanalyse durchgeführt, wobei versucht wird, die Purine bis zu einem Gehalt von $10^{-3}\%$ zu erfassen.

Die bekannten Methoden^{1-12, **} zur Routinebestimmung von Purinen in coffeinhaltigen Drogen bzw. in wäßrigen Aufgüssen oder Lösungen beschränken sich im wesentlichen auf die Bestimmung des Coffeins und Theobromins, lassen sich aber in geeigneter Form auch auf Theophyllin¹³ anwenden. Sie beruhen auf dem Prinzip, das betreffende Xanthinderivat aus seinen Verbindungen in Freiheit zu setzen, es dann mit geeigneten Lösungsmitteln möglichst quantitativ zu extrahieren und schließlich im Extrakt — eventuell nach Reinigung — den Gehalt zu bestimmen. Manche Methoden schreiben hierbei für fetthaltige Drogen (Kakao, Kaffee) eine vorhergehende Entfettung mit Petroläther vor.

Ein Vergleich dieser und ähnlicher Vorschriften zeigt, daß auf die alkalische Abspaltung der Purine entweder verzichtet werden kann^{1, 14} oder daß man sie mit feuchtem Magnesiumoxyd^{3, 9, 10, 15, 16}, wäßrigem Ammoniak^{2, 5, 17-24} oder Natronlauge^{6, 13, 25, 26} durchführt. Auch feuchtes Calciumoxyd²⁷, Sodalösung⁴ und tert. Natriumphosphat²⁸ kommen zur Anwendung, während *Oehrli*²⁹ bei Guaraná die Spaltung mit verdünnter Schwefelsäure vorzieht. Zur Extraktion erweisen sich außer Chloroform noch Tetrachlorkohlenstoff^{1, 5, 20, 27} und Tetrachloräthylen⁹ sowie

* Herrn Prof. Dr. *Ludwig Ebert* zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

** Die Fußnoten stehen am Schlusse dieser Arbeit.

Wasser^{14, 15, 22, 26, 30-32} und Alkohol^{3, 33} als geeignet. Auch Essigester³⁴, Benzol³⁵ und Gemische von Chloroform-Isopropylalkohol¹³ bzw. Chloroform-Phenol^{36, 37} werden als Extraktionsmittel beschrieben. Die Beseitigung von Verunreinigungen kann vor oder nach der Extraktion geschehen. Hierzu können Schwefelsäure^{3, 6, 13, 18, 19, 25}, Wasserstoffsperoxyd², Kaliumpermanganat^{1, 2, 5, 14, 16, 20, 26, 27, 31} und Kupfersulfat^{4, 20, 26, 28} dienen, auch Bleiacetat^{14, 22, 31, 38}, Aluminiumacetat²⁷, Zinkacetat und Kaliumcyanoferrat-II^{15, 23, 28} oder Zinkcyanoferrat-II¹⁶ fällen Schwebstoffe und störende Verbindungen.

Für die Bestimmung der Methylxanthine steht eine Reihe gravimetrischer, titrimetrischer und optischer Verfahren zur Verfügung: Direkte Wägung des abgedampften Extraktes^{10, 21, 30, 32}, Wägung nach vorheriger Reinigung^{1-6, 13, 14, 17-19, 25-27, 34}, Wägung des aus Tetrachloräthylenlösung mittels Äther gefällten Theobromins^{9, 39, 40}, Fällung des Coffeins mit Silicowolframsäure und Wägen der geglühten Oxyde⁴¹, quantitative Sublimation^{29, 42}, Fällung von Theophyllin mit Kupferacetat in absol. Methylalkohol⁴³, Berechnung aus dem Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl*^{1, 15, 17, 21, 28, 29, 31, 39, 40, 44}, Fällung mit Jod und Rücktitration des Jodüberschusses^{7, 11, 33, 45-48}, Coffeintitration mit Kaliumbromat^{20, 48, 49}, Fällung mit ammoniakal. Silberlösung und Rücktitration des Ag⁺-Überschusses nach *Volhard*^{78, 37, 50-52}, Fällung mit neutralem Silbernitrat und alkalimetrische Bestimmung der in Freiheit gesetzten Salpetersäure^{12, 14, 24, 53, 54}, Titration von Coffein mit Perchlorsäure in wasserfreier Ameisensäure⁵⁵⁻⁵⁷, Nephelometrie der Fällung von Coffein mit Natriumphosphorwolframat⁵⁸, Kolorimetrie von angefärbtem Adenin⁵⁹ und schließlich refraktometrischer¹⁷ oder spektrophotometrischer^{16, 35, 60-62} Vergleich von Purin- und Standardlösungen.

Die Mehrzahl der Extraktionsmethoden liefert als Resultat die Summe von zwei oder mehreren Purinen, doch läßt sich unter geeigneten Arbeitsbedingungen auch die Bestimmung mehrerer Purine nebeneinander durchführen^{8, 15, 62-64}.

In den letzten Jahren wurden auch Chromatographierkolonnen mit Aluminiumoxyd⁶⁵ oder Stärke^{66, 67}, Gegenstromverteilung⁶⁸ und Ionenaustauscher⁶⁹⁻⁷³ zur Trennung oder Reinigung von Purinen verwendet, vor allem aber bot die Entwicklung der Papierchromatographie (vgl. die Monographien⁷⁴⁻⁷⁶) und der Papierelektrophorese neue Möglichkeiten für die Analyse von Puringemengen. Die Trennung von Oxy- und Aminopurinen durch Papierchromatographie wurde zuerst von *Vischer-Chargaff*⁷⁷ und von *Hotchkiss*⁷⁸ durchgeführt, denen Arbeiten von *Markham* und *Smith*⁷⁹⁻⁸³, *Carter*⁸⁴ und *Löfgren*⁸⁵ folgten. Xanthin und seine Methyl-derivate wurden ebenfalls von *Markham-Smith*⁸⁰, ferner von *Munier* und *Macheboeuf*^{86, 87} und *Kogan* und Mitarb.⁸⁸ untersucht. Die papierelektrophoretische Auftrennung von Oxy- und Aminopurinen beschrieben *Wieland-Bauer*⁸⁹, *Dimroth* und Mitarb.⁹⁰, *Ghosh* und *Burma*^{91, 92} und *Werkheiser-Winzler*⁹³, die Trennung eines Coffein-Chinin-Gemisches *Scholz-Hagedorn*⁹⁴.

Die Purine lassen sich auf dem Papier auf Grund ihrer charakteristischen UV-Absorption oder durch Bildung von Metallsalzkomplexen auffinden. So erscheinen sie unter der UV-Lampe bei Verwendung geeigneter Filter als dunkle Flecken auf fluoreszierendem Grund^{78-80, 84, 85, 88, 92, 95} und können auf Spezialphotopapier kopiert werden^{79, 80, 96}. Die unveränderten Purine bleiben hierbei weiteren Untersuchungen zugänglich. Man kann auch das Papier mit Fluoreszeinlösung besprühen⁸⁹ oder durch Chlorwasser-oxydation⁹⁷ die Verwendung spezieller UV-Filter umgehen. Einige Oxy-

und Aminopurine bilden Quecksilbersalzkomplexe, die durch Ammoniumsulfid⁷⁷, Eosin oder Bromphenolblau⁹⁷ sichtbar werden. Adenin und Guanin geben auch eine Färbung mit AgNO_3 und $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ⁹⁸, Theobromin und Theophyllin mit Bi- oder Pt-Salz und KJ⁹⁹. Erwähnt sei noch die automatische Papyrographie nach *Hashimoto-Mori*¹⁰⁰.

Die quantitative Bestimmung der Purine wird meist spektrophotometrisch nach Ausschneiden und Eluieren der im UV-Licht markierten Purinflecke^{77, 79, 80, 84, 88, 92, 95} oder nach systematischem Zerschneiden und Eluieren des ganzen Streifens⁷⁸ durchgeführt.

Es erhob sich nun die Frage nach dem Vorkommen der verschiedenen Purinderivate in coffeinhaltigen Drogen, da z. B. im Tee neben Coffein auch Theophyllin, Methylxanthin, Adenin, Guanin und andere¹⁰¹ sowie Theobromin, Hypoxanthin und Xanthin¹⁰² und in geringer Menge Tetramethylharnsäure¹⁰³ gefunden wurden, während z. B. über Guaraná unseres Wissens in dieser Hinsicht noch keine Ergebnisse bekannt sind. Hierzu waren Methoden zu finden, die nicht nur eine möglichst vollzählige Erfassung und Bestimmung der Purine erlauben, sondern auch empfindlich genug sind, um Spuren wenigstens qualitativ mit Sicherheit erkennen zu können. Die herkömmlichen Analysemethoden erschienen hierzu nicht genügend erfolgversprechend, sodaß die Wahl auf die empfindlichen und sehr spezifischen Verfahren der Papierchromatographie und -elektrophorese fiel. Dazu kam, daß diese Verfahren — abgesehen von den Untersuchungen über Nucleinsäuren und ihre Bestandteile sowie über künstliche Puringemische — bisher nur in Einzelfällen^{88, 89} auf purinhaltige Pflanzen angewendet worden sind. Bei unserer Arbeit legten wir besonderen Wert auf die Untersuchung hinsichtlich Coffein, Theobromin, Theophyllin, Adenin, Guanin, Xanthin und Hypoxanthin und versuchten, diese Purine bis zu einer Konzentration von $10^{-3}\%$ zu erfassen.

Untersuchtes Material.

Zur Untersuchung dienten bis zu 100 g der handelsüblichen Sorten von

a) Pasta Guaraná (von *paullinia cupana*), und zwar von drei industriell (Rio de Janeiro) bzw. von Eingeborenen (Matto Grosso) hergestellten Proben¹⁰⁴,

b) grünen Kaffeebohnen (semen *coffea* von *coffea arabica*), Sorte „Rio V“ der Ernte 1952 (Brasilien),

c) ungeschälten Kakaobohnen (von *theobroma cacao*), Sorte „Accra“, gut fermentiert, Hauptanbau 1952 (Afrika),

d) „weiblichen“ Kolanüssen (von *cola acuminata*),

e) Mate (*Yerba-maté*) in Schuppen (von *ilex paraguayensis*¹⁰⁵),

f) schwarzem Tee (von *thea sinensis*), und zwar „Java-Tee“ der Firma Julius Meinl A. G., Wien.

Methoden.

Bei den angewendeten Untersuchungsverfahren sind zu unterscheiden:

1. Aufbereitung des Materials und Herstellung geeigneter Extrakte,
2. Zerlegung der Extrakte nach Purinkomponenten,
3. Nachweis und Identifizierung der Purine,
4. Quantitative Bestimmung.

Zu 1: Aufbereitung des Materials und Herstellung geeigneter Extrakte.

Das lufttrockene Material wurde möglichst fein pulverisiert und in einer kleinen Probe die Feuchtigkeit als Trocknungsverlust bestimmt. Kakao und Kaffee mußten zunächst im Soxhlet mit Petroläther (50 bis 60°) entfettet werden; beim Kakao war nach Entfernung der Hauptmenge Kakaobutter gelindes Kochen mit der doppelten Gewichtsmenge 5 n HCl durch 15 Min., Trockendampfen auf dem Wasserbad im Vak. und neuerliche Petrolätherextraktion bis zur Erschöpfung nötig. Die so erhaltenen Anteile von Kakaobutter bzw. Kaffeeöl wurden zur Wiedergewinnung mitgelöster oder mitgerissener Purine 3mal unter kräftigem Umschütteln mit ihrem Volumen an 0,01 n HCl einige Min. gekocht. Die gesammelten wäßr. Schichten wurden mit wenig Petroläther entfettet und im Vak. abgedampft. Die verbliebenen Purine wogen weniger als 1% der späteren Extrakte.

Nun setzten wir die Purinbasen der Probe durch inniges Verreiben des Pulvers mit 20 Gew.-% konz. Ammoniak in Freiheit und extrahierten die Masse im Soxhlet mit feuchtem Chloroform, welches 3mal mit etwa $\frac{1}{4}$ Vol. Wasser geschüttelt und dann abdestilliert worden war. Wir wechselten das Lösungsmittel nach 1 bis 4 Stdn. und nach 1 bis 2 Tagen und erhielten so 3 Fraktionen. Nach Erschöpfung wurde der Rückstand vom Chloroform befreit und mit einem Alkohol-Chloroform-Gemisch (3 : 7 Vol.) unter Abtrennung von 2 bis 3 Fraktionen weiter extrahiert. Eine abschließende längere Extraktion mit 96%igem Alkohol erfaßte fallweise noch vorhandene Purinreste. Alle Fraktionen wurden abgedampft, im Vakuumexsikkator getrocknet und gewogen.

Wir erreichten auf diese Weise eine grobe Vortrennung der gesuchten Substanzen: in den Chloroformfraktionen fanden sich zuerst Coffein, dann Theophyllin bzw. Theobromin, während die Amino- und Oxypurine im allgemeinen erst in den späteren Fraktionen auftraten (vgl. Tabelle 3).

Da in einigen Fällen besonders die späteren Fraktionen (z. B. Guaraná IV und Tee V) stark mit gefärbten und fluoreszierenden Substanzen verunreinigt waren, welche den Nachweis der Purine auf dem Filtrierpapier störten, wurde eine Anreicherung versucht. Die Verwendung von Ionenaustauschersäulen (Amberlit IR 4 B) führte nicht zum Ziel, hingegen konnten die Oxy- und Aminopurine durch Fällung mit ammoniakal. Silbernitratlösung¹⁰⁶ genügend rein erhalten werden, um diese Substanzen qualitativ nachweisen und ihre Menge nach der Größenordnung abschätzen zu können. Die Abscheidung des überschüssigen Silbers durfte hierbei nicht mit Natriumsulfid (nach Anm. 106), sondern nur mit Schwefelwasserstoff analog der Vorschrift von Kossel¹⁰⁷ erfolgen.

Zu 2: Zerlegung der Extrakte nach Purinkomponenten.

Die Auftrennung jeder Fraktion wurde auf drei Arten versucht:

- a) Durch Papierelektrophorese (PEP) auf Schleicher & Schüll-Papier

Nr. 2043 b glatt. Hierbei wurde die früher¹⁰⁸ beschriebene Apparatur verwendet; als Puffer sind folgende Lösungen geeignet:

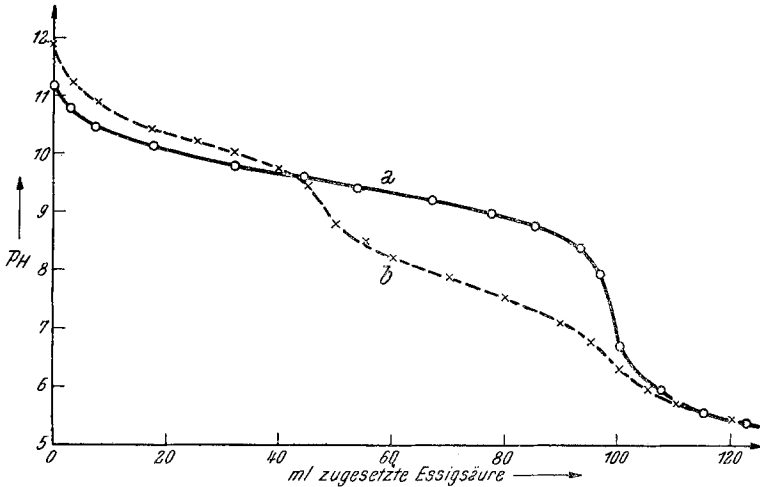


Abb. 1. Elektrometrische Titration von Ammoniak und Äthylendiamin mit Essigsäure:
 a) 100 ml 1 n Ammoniak mit 1 n Essigsäure titriert.
 b) 100 ml 1 n Äthylendiamin mit 1 n Essigsäure titriert.

Sauer (für Adenin und Guanin):

Eisessig : Pyridin : Wasser (10 : 1 : 89) = EP. 10, pH = 3,6.

Alkalisch (für Theobromin, Theophyllin, Hypoxanthin und Xanthin):

1 n Ammoniak : 1 n Essigsäure : Wasser (1,5 : 1 : 2) = AE. 1,5, pH = 9,2;

1 n Ammoniak : 1 n Essigsäure : Wasser (9 : 1 : 10) = AE. 9, pH = 10,3;

1 n Ammoniak : 1 n Essigsäure (20 : 1) = AE. 20, pH = 10,6;

1 n Äthylendiamin : 1 n Essigsäure (20 : 1) = enE. 20, pH = 11,1.

Die pH-Werte einiger alkalischer Puffergemische sind aus Abb. 1 (vgl. ¹⁰⁹) zu entnehmen, wobei die Basen entsprechend den Versuchsbedingungen nicht erst CO₂-frei gemacht wurden. Die Beweglichkeit und Auftrennungsschärfe (vgl. Abb. 2) der Purine waren in Ammoniak- und Äthylendiaminpuffern von gleichem pH gleich, doch wurde die Empfindlichkeit des Fluoreszenznachweises durch Äthylendiamin etwas beeinträchtigt. Coffein zeigte in den angegebenen Pufferlösungen nur die durch Elektro-

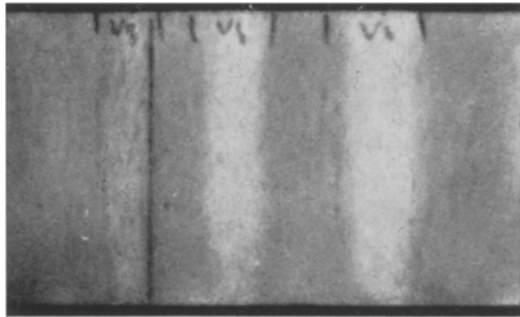


Abb. 2. Elektrophoretische Trennung von Coffein, Theobromin und Theophyllin bei pH 10,6. Photographiert wurde die violette Fluoreszenz der Purine im UV-Licht nach Chlorwasserstoffoxydation.

osmose bzw. Pufferströmungen hervorgerufene Wanderung und wurde daher zur Nullpunktmarkierung verwendet. Tabelle 1 gibt eine Zusammenstellung der scheinbaren Beweglichkeitswerte, welche in der Regel Schwankungen unter 10% aufweisen; beim Gemisch AE. 20 können infolge der Flüchtigkeit des Ammoniaks und der geringen Pufferkapazität dieser Lösung auch größere Abweichungen auftreten.

Tabelle 1. Durchschnittliche scheinbare Beweglichkeit von Purinen bei der Papierelektrophorese nach *Michl*¹⁰⁸.
Feldstärke 25 bis 40 [V/cm], u [cm² Volt⁻¹ sec.⁻¹].
Vorzeichen bei Wanderung zur Kathode +, zur Anode —.

Purin	EP. 10 Eisessig: Pyridin: Wasser (10: 1: 89) pH=3,6		AE. 1,5 1 n NH ₄ OH: 1 n AcOH: Wasser (1,5: 1: 2) pH=9,2		AE. 9 1 n NH ₄ OH: 1 n AcOH: Wasser (9: 1: 10) pH=10,3		AE. 20 1 n NH ₄ OH: 1 n AcOH (20: 1) pH=10,6	
	10 ⁵ · u	u/u _{Ade}	10 ⁵ · u	u/u _{Xan}	10 ⁵ · u	u/u _{Xan}	10 ⁵ · u	u/u _{Xan}
Adenin	+ 6,3	1	geringe Wanderung zur Anode				— 0,8	0,12
Guanin	+ 2,1	0,33	— 4,1	1	— 6,3	1	— 6,4	1
Xanthin	—	—	— 0,7	0,17	— 5,2	0,83	— 5,3	0,83
Hypoxanthin	0	0	— 1,6	0,39	— 5,5	0,87	— 7,3	1,14
Theophyllin	0	0	—	—	— 2,2	0,35	— 2,8	0,44
Theobromin	—	—	—	—	0	0	0	0
Coffein	0	0	0	0	0	0	0	0

Der Feuchtigkeitsgehalt der in die Pufferlösungen getauchten und anschließend zwischen mehrfachen Fließpapierlagen abgepressten Papierstreifen schwankte zwischen 95 und 100% des Trockengewichtes. Die Substanzproben wurden in Pufferlösung aufgenommen und mittels eines Haarpinsels, für quantitative Zwecke mit Mikromeßpipetten (15 bis 40 μ l) aufgetragen. Nach dem Versuch wurden die Streifen einige Min. bei 70 bis 100° im Trockenschrank getrocknet, bis der Geruch des Puffers völlig verschwunden war.

b) Durch aufsteigende Papierchromatographie (PCG) auf Papier S. & S. Nr. 2043 a rauh. Die folgenden herkömmlichen Gemische erwiesen sich als Verteilungsmittel zweckmäßig:

„HCOOH“ = n-Butanol: Ameisensäure: Wasser (77: 10: 13)⁸⁰;

„NH₃“ = n-Butanol: konz. Ammoniak: Wasser (82: 5: 13) (vgl. ⁸⁰);

„Phos“ = 5% wäßr. Na₂HPO₄: Isoamylalkohol (2: 1)⁸⁴.

Die in der Literatur angegebenen R_f -Werte konnten — abgesehen von temperaturbedingten Schwankungen — im allgemeinen reproduziert werden, doch trat manchmal bei stark verunreinigten Fraktionen eine Verschiebung der R_f -Werte ein. Insbesondere störte bei Vorversuchen nicht entfetteter Kaffee; das Kaffeeöl verminderte den R_f -Wert des Coffeins beträchtlich. Durch Ausschneiden des auf einem Vergleichsstreifen lokalisierten Coffeinfleckes und Übertragung auf ein neues Chromatogramm¹¹⁰ konnte der R_f -Wert des Coffeins richtig erhalten werden.

c) Durch Zirkularpapierchromatographie (ZCG) auf Papier Nr. 2043 a rauh¹¹¹. Die Methode ist für einphasige Verteilungsmittel (HCOOH und

NH₃) geeignet und bildet eine nützliche Ergänzung der aufsteigenden Papierchromatographie besonders für Substanzen mit kleinen *R_f*-Werten.

Bei mengenmäßig starkem Überwiegen eines Purins kam es vor, daß ein einfaches Papierchromatogramm die Erfassung der Spuren nicht mehr erlaubte. So enthielt bei Vorversuchen eine Fraktion aus Guaranápaste

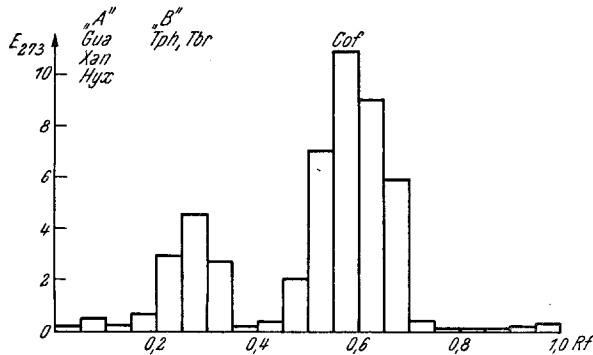


Abb. 3. Spektrophotogramm von 6 mg einer Guaraná-Extraktfraktion, auf 6 cm breitem Streifen aufgetragen und nach Papierchromatographie mit Butanol-Ammoniak-Gemisch und darauffolgender systematischer Eluierung bei 273 m μ gemessen. Mengenverhältnis von Guanin: Theophyllin: Coffein etwa 1: 100: 400.

nur rund den hundertsten Teil an Guanin, Xanthin, Hypoxanthin und Theobromin gegenüber Theophyllin bzw. den vierhundertsten Teil gegenüber Coffein. Das Spektrophotogramm eines mit „NH₃“ entwickelten Papierchromatogramms dieser Fraktion (Abb. 3) zeigte neben dem Coffein-

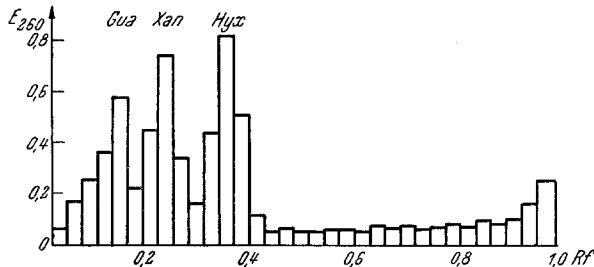


Abb. 4. Spektrophotogramm der Fraktion „A“ (vgl. Abb. 3, *R_f* 0,03—0,12), welche aus einem 24 cm breiten Papierchromatogramm von 25 mg Extrakt eluiert worden war, nach Chromatographie mit Butanol-Ameisensäure-Gemisch und systematischer Eluierung bei 260 m μ gemessen.

maximum lediglich zwei Maxima bei *R_f* = 0,08 und 0,28. Da für diese *R_f*-Werte die genannten fünf Purine in Frage kamen, mußte entschieden werden, ob die Maxima nur von je einem oder von mehreren Purinen verursacht waren. Hierzu wurde reichlich (etwa 25 mg) Substanz eingewogen, auf einer 24 cm langen Startlinie auf das Papier aufgetragen und wie ursprünglich im „NH₃“-Gemisch chromatographiert. Nach Ausschneiden und Eluierung der fraglichen Zonen ergab die Papierchromatographie der eingedampften Eluate im „HCOOH“-Gemisch auf Grund der Spektrophotogramme (Abb. 4

und 5), daß alle genannten Komponenten nebeneinander vorhanden waren. Während sich Guanin, Xanthin und Hypoxanthin, die in annähernd gleicher Menge vorhanden waren, durch deutlich getrennte Maxima unterschieden, war das Theobromin wegen seiner geringen Menge nur als Unstetigkeit im Anstieg der vom Theophyllin verursachten Extinktion zu erkennen. Der qualitative Nachweis des Theobromins erfolgte außerdem durch ein „HCOOH“-Chromatogramm der nächsten Extraktionsfraktion, in der dieses Purin relativ angereichert war.

Zu 3: Nachweis und Identifizierung der Purine.

Zum qualitativen Nachweis der Purine auf dem Papier wurde von fünf Methoden Gebrauch gemacht:

a) Fluoreszenz im nahen UV nach Oxydation mit Chlorwasser und Be-
gasung mit Ammoniak (Cl)⁹⁷. Hierbei waren alle gesuchten Purine, zum Teil mit verschiedener Fluoreszenzfarbe, zu erkennen (vgl. ¹¹²).

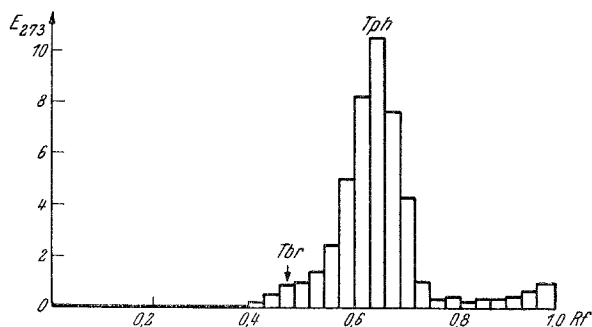


Abb. 5. Spektrophotogramm der Fraktion „B“ (vgl. Abb. 3, R_f 0,14—0,35), welche aus dem gleichen Chromatogramm wie Fraktion „A“ gewonnen worden war, nach Papierchromatographie mit Butanol-Ameisensäure-Gemisch und systematischer Eluierung bei 273 $m\mu$ gemessen.

b) Gelbfärbung nach Besprühen mit 0,4%iger alkohol. Chloranilsäurelösung (ClAS). Von den untersuchten Substanzen gab nur Coffein eine positive Reaktion, welche als Modifikation der von *Barreto*¹¹³ angegebenen Tüpfelreaktion zu betrachten ist. Chloranilsäure wurde nach *Graebe*¹¹⁴ aus Chloranil dargestellt. Das Reagens ist in frisch bereiteter Lösung zu verwenden, das zu besprühende Papier muß frei von Säuren oder Basen sein.

c) Blaufärbung durch Eintauchen des Streifens in eine 0,2%ige Bromphenolblau-Lösung in sublimatgesättigtem 96%igem Alkohol (HgB) (20 mg Bromphenolblau und 3,25 g $HgCl_2$ auf 10 ml 96%igen Alkohol). Der Farbstoffüberschuß wurde mit fließendem Wasser ausgewaschen. Es wurden hierbei nur die Purine Adenin und Guanin angefärbt⁹⁷, sie unterschieden sich von der grünblauen Färbung wasserlöslicher Aminosäuren und Peptide¹¹⁵ durch hellblauen Farbton. Die Farbreaktion ist auch auf Alkaloide anwendbar, z. B. gaben die im Tabak vorkommenden Alkaloide Nicotin, Nornicotin und Anabasin ein deutliches Schwarzblau.

d) Rotfärbung mit 0,2%iger Eosin-Sublimat-Lösung (HgE) (20 mg Eosin und 3,25 g $HgCl_2$ auf 10 ml 96%igen Alkohol). Das Auswaschen wurde erst gründlich in 96%igem Alkohol, dann im Fließwasser vorgenommen. So konnten Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure sichtbar

gemacht werden⁹⁷. Die Reaktion war noch empfindlicher als die mit Bromphenolblau und ebenfalls auf Nicotin, Normicotin und Anabasin anwendbar.

e) Systematisches Zerschneiden der Papierchromatogramme oder Papier-
elektropherogramme, Eluierung der Streifen und Ausmessen der Eluate
mit dem *Beckman*-Spektrophotometer (SPM)⁷⁸.

Zu 4: Quantitative Bestimmung.

Drei der genannten Nachweismethoden waren auch für die quantitative Bestimmung geeignet: Die Farbreaktionen mit Bromphenolblau und mit Eosin gaben bei genormten Anfärbe- und Auswaschbedingungen nach Ausschneiden der Farbzonen und Eluierung mit warmer 0,02 m Sodalösung brauchbare quantitative Werte. Die Eluate wurden spektrophotometriert (HgB bei 597 m μ , HgE bei 519 m μ). Die Methode 3 e (SPM) lieferte durch Vergleich mit Standardlösungen bei konstanten Arbeitsbedingungen gute Resultate (Eluierung mit 5 ml 0,01 n HCl in drei gleichen Portionen, je 30 Min. auf dem Wasserbad digeriert). Die Oxy- und Aminopurine wurden hierzu einheitlich bei 260 m μ , die Methylxanthine einheitlich bei 273 m μ gemessen.

Tabelle 2. Erfassungsgrenzen der Nachweis- und Bestimmungsmethoden für Purine.
(Mengen in 10⁻⁶ g.)

Purin	Chlorwasser u. NH ₃ (Cl)	0,4% Chloranilsäure (ClAS)	0,2% Bromphenolblaugesättigte Sublimatlösung (HgB)		0,2% Eosin-gesättigte Sublimatlösung (HgE)		BECKMAN Spektrophotometer (SPM)
	qual.	qual.	qual.	quant.	qual.	quant.	quant.
Coffein	0,5 violett	50 gelb	—	—	—	—	2
Theobromin	0,5 violett	—	—	—	—	—	2
Theophyllin	0,5 violett	—	—	—	—	—	2
Harnsäure	1 bläulich	—	—	—	0,2	10	2
Xanthin	1 bläulich	—	—	—	0,2	10	2
Hypoxanthin	1 bläulich	—	—	—	0,2	10	2
Adenin	1 grünlich	—	1	5	0,2	10	2
Guanin	1 grünlich	—	1	5	0,2	10	2

Zusammenfassend gesagt, wendeten wir also bei unseren Untersuchungen eine fraktionierte Extraktionsmethode an und fügten den bekannten chromatographischen und elektrophoretischen Trennverfahren die Papier-

Tabelle 3. Purinvorkommen in coffeinhaltigen Drogen.

Droge	Purin	feuchtes Chlf.						80% A.-Chlf.		96% Alk.	Summe %	qual. Nachweis	quant. Bestimmung
		I	II	III	IV	V	VI						
Guaraná	Cof	+++	+++	+						4,49	HCOOH/Cl NH ₃ /Cl AE. 20/Cl CIAS	NH ₃ /SPM AE. 20/SPM	
	Tbr	+	+						≈ 0,003	HCOOH/Cl HCOOH/SPM NH ₃ /SPM	HCOOH/SPM		
	Tph	+++	++	+					0,28	HCOOH/Cl NH ₃ /Cl	NH ₃ /SPM EP. 10/HgB		
	Ade		×	+	+	×			0,0045	NH ₃ /Cl EP. 10/HgB	NH ₃ /SPM EP. 10/HgB		
	Gua		×	+	+				≈ 0,005	HCOOH/Cl HCOOH/SPM NH ₃ /Cl	HCOOH/SPM		
	Xan		×	+	+				≈ 0,006	NH ₃ /Cl NH ₃ /SPM Phos/HgE	HCOOH/SPM		
	Hyx		+	+	+				≈ 0,008	HCOOH/Cl Phos/Cl NH ₃ /Cl	HCOOH/SPM		
Kaffee	Cof	+++	+++	×					0,896	HCOOH/Cl NH ₃ /Cl CIAS	AE. 20/SPM HCOOH/SPM		

Kaffee	Ade								Phos/HgB EP. 10/HgB
	Gua		+	×					HCOOH/Cl EP. 10/HgB
	Xan				×				HCOOH/HgE AE. 20/HgE
	Hyx		×						Phos/HgE AE. 20/HgE
Kakao	Cof						×		HCOOH/Cl AE. 20/Cl ClAS HCOOH/SPM
	Tbr			×		++	++		HCOOH/Cl NH ₃ /Cl AE. 20/Cl HCOOH/SPM AE. 20/SPM
	Ade		++						HCOOH/HgB EP. 10/HgB
	Gua		×						HCOOH/Cl Phos/HgB Phos/HgB
Kola	Cof								HCOOH/Cl NH ₃ /Cl AE. 20/Cl ClAS HCOOH/SPM AE. 20/SPM
	Tbr						+		HCOOH/Cl AE. 20/Cl AE. 20/SPM
	Ade					+			HCOOH/Cl EP. 10/HgB EP. 10/HgB
	Hyx						×		HCOOH/Cl ---

Abkürzungen und Zeichen zu Tabelle 3:

Purine: Cof = Coffein,	Xan = Xanthin,
Tbr = Theobromin,	Hyx = Hypoxanthin,
Tph = Theophyllin,	Ade = Adenin,
Hsr = Harnsäure,	Gua = Guanin.

Trennungsmethoden: PEP = Papierelektrophorese, und zwar:

AE. 20 = 1 n Ammoniak : 1 n Essigsäure (20 : 1),
EP. 10 = Eisessig : Pyridin : Wasser (10 : 1 : 89).
PCG = Papierchromatographie, und zwar:
HCOOH = n-Butanol : Ameisensäure : Wasser (77 : 10 : 13),
NH ₃ = n-Butanol : konz. Ammoniak : Wasser (82 : 5 : 13),
Phos = 5% wäbr. Na ₂ HPO ₄ -Lösung : Isoamylalkohol (2 : 1).

Nachweismethoden:

Cl	= UV-Fluoreszenz nach Chlorwasseroxydation,
CIAS	= Anfärbung mit Chloranilsäurelösung (Spray),
HgB	= „ „ Bromphenolblau-Sublimat-Lösung (Bad),
HgE	= „ „ Eosin-Sublimat-Lösung (Bad),
SPM	= Spektrophotometrie nach Eluierung.

Mengenangabe:

++++ = über 1%,	+ = 0,001 bis 0,01%,
+++ = 0,1 bis 1%,	× = Spur.
++ = 0,01 bis 0,1%,	

elektrophorese von Theophyllin, Theobromin, Xanthin und Hypoxanthin bei pH 9 bis 11 hinzu. Zum Nachweis des Coffeins auf dem Papier wurde die Chloranilsäurefärbung neu eingeführt; die Farbreaktionen einzelner Purine mit Bromphenolblau bzw. Eosin wurden auch für die quantitative Bestimmung ausgewertet.

Ergebnisse und Diskussionen.

Die Anwendung der beschriebenen Methodik auf die sechs untersuchten Drogen ergab folgendes Bild:

Danach kam in den Guaranáproben neben Coffein nur Theophyllin in nennenswerter Menge vor, während Hypoxanthin, Xanthin, Guanin, Adenin und Theobromin nur als Spuren mit einem Gehalt unter 10⁻²% nachgewiesen werden konnten. Dieses Ergebnis stimmt bezüglich des Coffeingehaltes mit den Arbeiten von *Bertrand-Carneiro*¹¹⁶ gut überein, da in der von Eingeborenen hergestellten Paste 4,65, in der industriellen nur 4,33% Coffein gefunden wurden (vgl.¹¹⁷). Die Feststellung dieser Autoren, daß in der Guaraná nur Coffein als wirksame Substanz enthalten sei, trifft auf die hier untersuchten Proben nicht mehr zu, da die angewendeten Nachweismethoden empfindlicher sind. Festzuhalten ist ferner, daß *Bertrand-Carneiro* bei der systematischen Untersuchung der

Guaraná¹¹⁸ in verschiedenen Organen dieser Pflanze viel Theobromin, jedoch kein Theophyllin fanden, während in den hier untersuchten Proben von Guaranápaste das Verhältnis Theophyllin : Theobromin rund 100 : 1 betrug. Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse¹⁰² gibt für Guaraná ebenfalls nur Coffein und Theobromin an, während wir in dieser Droge auch alle anderen hier untersuchten Purine nachweisen konnten.

Ein ähnlicher Widerspruch zu bisherigen Analysenergebnissen trat bei der Untersuchung von „Java-Tee“ auf. Hier wurde im Vergleich zu Theophyllin etwa die zehnfache Menge Theobromin gefunden, während in der Literatur unseres Wissens bisher Theophyllin¹⁰¹ als reichlicher vorhandenes Nebenpurin angegeben wurde. Die Anwesenheit von Xanthin, Hypoxanthin, Adenin und Guanin fanden wir bestätigt.

Bei den übrigen Drogen traten keine Widersprüche zu früheren Analysen auf, die jedoch meist nur den Coffeingehalt angeben. Der qualitative Nachweis einiger Purine (Theobromin, Theophyllin und Adenin im Mate, Adenin und Hypoxanthin in der Kolanuß sowie Adenin und Guanin in Kakaobohnen) und die Bestimmung oder zumindest Abschätzung der Oxy- und Aminopurine wurde unseres Wissens hier erstmalig angegeben.

Dieser Arbeit kam eine Zuwendung zugute, welche die Rockefeller Foundation dem Vorstand des II. Chemischen Laboratoriums der Universität Wien, Herrn Prof. Dr. F. Wessely, zur Unterstützung der unter seiner Leitung ausgeführten Arbeiten gewährt hat. Wir danken hierfür sowie für die Hilfe, die einer von uns (H. M.) von der Österreichischen Akademie der Wissenschaften aus den Mitteln der Seegen-Stiftung erhalten hat.

Literatur.

¹ K. Lendrich und E. Nottbohm, Z. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel **17**, 241 (1909).

² G. Fendler und W. Stüber, Z. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel **28**, 9 (1914).

³ F. B. Power und V. K. Chesnut, J. Amer. Chem. Soc. **41**, 1298 (1919).

⁴ W. Uglow und A. Schapiro, Z. Unters. Lebensmittel **55**, 149 (1928).

⁵ J. Grossfeld und G. Steinhoff, Z. Unters. Lebensmittel **61**, 38 (1931).

⁶ F. F. Cortes, Actas y trabajos tercer congreso sudamericano de química **6**, 214 (1937); Chem. Abstr. **34**, 7471⁹ (1940).

⁷ G. Wallrabe, Apothek.-Ztg. **46**, 341 (1931).

⁸ C. Monthulé, Z. Unters. Lebensmittel **26**, 676 (1913).

⁹ R. V. Wadsworth, Analyst **46**, 32 (1921).

¹⁰ J. Pritzker und R. Jungkuntz, Mitt. Lebensm. Hyg. **34**, 185 (1943).

¹¹ W. O. Emery und G. C. Spencer, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **10**, 605 (1918).

¹² H. Boie, Pharmaz. Ztg. **75**, 968 (1930).

¹³ *F. Reimers*, Dansk Tidsskr. Farmac. **9**, 11 (1935); Chem. Zbl. **1935 I**, 1898.

¹⁴ *J. Hasselmann* und *A. Lopes da Cruz*, Rev. alimentar. (Rio de Janeiro) **4**, Nr. **31**, 7 (1940); Chem. Abstr. **39**, 2160^s (1945).

¹⁵ *R. G. Moores* und *H. A. Campbell*, Analyt. Chemistry **20**, 40 (1948).

¹⁶ *N. H. Ishler*, *T. P. Finucane* und *E. Borker*, Analyt. Chemistry **20**, 1162 (1948).

¹⁷ *G. v. Mikó*, Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Ertesítője **6**, 30 (1930); Chem. Zbl. **1930 I**, 2286.

¹⁸ *F. Martin* und *H. Clergue*, Ann. chim. analyt. chim. appl. (4), **24**, 202 (1942); Chem. Zbl. **1943 I**, 2219.

¹⁹ *N. E. Bühner*, Arquiv. biol. e tecnol., Inst. biol. e pesquisas tecnol. Curitiba, Brasilien **1**, 177 (1946); Chem. Abstr. **42**, 3290 a (1948).

²⁰ *L. V. Fungairiño* und *P. García-Puertas*, Anales bromatol. (Madrid) **1**, 219 (1949); Chem. Abstr. **44**, 7461 f (1950).

²¹ *M. Bertrand*, Ann. pharm. franç. **8**, 637 (1950); Z. analyt. Chem. **133**, 384 (1951).

²² *R. M. Serra*, Anales Univ. Santo Domingo **9**, 103 (1945); Chem. Abstr. **41**, 1811 f (1947).

²³ *J. D. Kidd*, *H. R. Nanji* und *F. W. Edwards*, Analyst **66**, 240 (1941).

²⁴ *K. W. Gerritsma* und *J. Koers*, Analyst **78**, 201 (1953).

²⁵ *V. Lucas*, Rev. farm. e odontol. (Nieteroy) **14**, 299 (1947); Chem. Abstr. **42**, 6055 f (1948).

²⁶ *N. Silvestri*, Boll. chim. farm. **87**, 236 (1948); Chem. Abstr. **43**, 1689 f (1949).

²⁷ *G. Scotti*, Boll. chim. farm. **77**, 403, 444 (1938); Chem. Zbl. **1939 I**, 839.

²⁸ *F. J. T. Harris*, J. Sci. Food Agr. **4**, 205 (1953); Chem. Abstr. **47**, 6066 c (1953).

²⁹ *A. Oehrlí*, Pharmaceut. Acta Helv. **2**, 155 (1927).

³⁰ *G. Bertrand* und *T. Devuyt*, Bull. sci. pharmacol. **17**, 249 (1910); Chem. Zbl. **1910 II**, 332.

³¹ *J. Delga*, Ann. pharm. franç. **1**, 72 (1943); Chem. Zbl. **1943 II**, 1761.

³² *O. de Almeida Costa* und *A. Allemand*, Rev. brasil. farm. **30**, 227 (1948); Chem. Abstr. **43**, 5904 e (1949).

³³ *M. v. Breukeleveen*, Chem. Weekbl. **24**, 206 (1927); Chem. Zbl. **1927 II**, 302.

³⁴ *S. Gobert*, Ann. Falsifications **24**, 288 (1931); Chem. Zbl. **1931 II**, 1778.

³⁵ *J. Axelrod* und *J. Reichenthal*, J. Pharmacol. Exp. Therap. **107**, 519 (1953).

³⁶ *A. E. Parkes* und *H. A. Parkes*, Analyst **62**, 791 (1937).

³⁷ *N. S. Gorjainowa*, Chem.-pharmaz. Ind. (russ.) **1932**, 227; Chem. Zbl. **1933 I**, 3338.

³⁸ *Y. Sakato*, J. Agric. Chem. Soc. Japan, Bull. **16**, 739 (1940); Chem. Zbl. **1943 II**, 1153.

³⁹ *J. A. McDonald*, Annu. Rep. Cacao Res. **6**, 43 (1937); Chem. Zbl. **1937 II**, 3253.

⁴⁰ *J. Kay* und *P. J. C. Haywood*, Analyst **71**, 162 (1946).

⁴¹ *A. Bonn* und *Ch. Desgrez*, Ann. Falsifications **24**, 546 (1931); Chem. Zbl. **1932 I**, 1172.

⁴² *T. Ugarte*, Chemia **7**, 490 (1930); Chem. Zbl. **1931 II**, 2234.

⁴³ *M. Péronnet*, C. r. acad. sci., Paris **229**, 886 (1949).

⁴⁴ *A. Taylor* und *D. J. Taylor*, Analyst **74**, 463 (1949).

- ⁴⁵ *A. Jermstad* und *O. zstby*, Dansk. Tidsskr. Farmac. **7**, 117 (1933); Chem. Zbl. **1933 II**, 1402.
- ⁴⁶ *P. Wade* und *J. Hannen*, J. Sci. Food Agr. **1**, 177 (1950); Chem. Abstr. **45**, 308 d (1951).
- ⁴⁷ *J. H. Wolff* und *F. Bister*, Z. analyt. Chem. **137**, 324 (1953).
- ⁴⁸ *P. Hagedorn*, Dtsch. Apothek.-Ztg. **92**, 430 (1952).
- ⁴⁹ *M. Carlassare*, Boll. chim. farm. **90**, 4 (1951); Chem. Abstr. **45**, 4606 e (1951).
- ⁵⁰ *J. v. Mikó*, Pharmaz. Mh. **14**, 279 (1933).
- ⁵¹ *P. W. Schmitt*, J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **19**, 821 (1930).
- ⁵² *A. N. Stevens* und *D. T. Wilson*, J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **26**, 314 (1937).
- ⁵³ *F. Vieböck*, Pharmaz. Presse, Wien **37**, 17 (1932).
- ⁵⁴ *F. Reimers* und *K. R. Gottlieb*, Dansk Tidsskr. Farmac. **17**, 105 (1943); Chem. Zbl. **1943 II**, 1483.
- ⁵⁵ *A. M. Shkodin*, *N. A. Izmailov* und *N. P. Dzyuba*, Zhur. Obshechi Khim. **20**, 1999 (1950); Chem. Abstr. **45**, 3225 a (1951).
- ⁵⁶ *K. Dimroth* und *H. G. Meyer-Brunot*, Biochem. Z. **323**, 338 (1952).
- ⁵⁷ *A. Poulos*, Analyt. Chemistry **24**, 1858 (1952).
- ⁵⁸ *E. Herndlhofer*, Mikrochem. **12** (N. F. 6), 227 (1932).
- ⁵⁹ *H. G. Koritz* und *F. Skoog*, Arch. Biochem. Biophysics **38**, 15 (1952).
- ⁶⁰ *R. S. Fisher*, *E. J. Algeri* und *J. T. Walker*, J. Biol. Chem. **179**, 71 (1949).
- ⁶¹ *H. R. Hernandez* und *A. M. Mattocks*, Bull. Natl. Formulary Comm. **19**, 1 (1951); Chem. Abstr. **45**, 5363 c (1951).
- ⁶² *H. S. Loring*, *J. L. Fairley*, *H. W. Bortner* und *H. L. Seagran*, J. Biol. Chem. **197**, 809 (1952).
- ⁶³ *W. E. Kunze*, Z. analyt. Chem. **33**, 1 (1894).
- ⁶⁴ *A. Bömer*, *A. Juckenack* und *J. Tillmans*, Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. VI, S. 123. Berlin: J. Springer. 1934. — *A. Kossel*, Z. physiol. Chem. **13**, 293 (1889).
- ⁶⁵ *H. Hadorn* und *R. Jungkunz*, Mitt. Lebensm. Hyg. **40**, 190 (1949).
- ⁶⁶ *P. Edman*, *E. Hammarsten*, *B. Löw* und *P. Reichard*, J. Biol. Chem. **178**, 395 (1949).
- ⁶⁷ *M. M. Daly* und *A. E. Mirsky*, J. Biol. Chem. **179**, 981 (1949).
- ⁶⁸ *J. F. Tinker* und *G. B. Brown*, J. Biol. Chem. **173**, 585 (1948).
- ⁶⁹ *S. C. Smith* und *S. H. Wender*, J. Amer. Chem. Soc. **70**, 3719 (1948).
- ⁷⁰ *W. E. Cohn*, Science **109**, 377 (1949).
- ⁷¹ *W. E. Cohn*, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 1471 (1950).
- ⁷² *E. G. Arraras*, Rev. fac. cienc. quim. Univ. nacl. La Plata **24**, 53 (1952); Chem. Abstr. **47**, 1865 h (1953).
- ⁷³ *J. S. Wall*, Analyt. Chemistry **25**, 950 (1953).
- ⁷⁴ *R. J. Block*, *R. Le Strange* und *G. Zweig*, Paper Chromatography. New York: Academic Press Inc. 1952.
- ⁷⁵ *F. Cramer*, Papierchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie. 1952.
- ⁷⁶ *E.* und *M. Lederer*, Chromatography. Amsterdam, Houston, London, New York: Elsevier Publishing Comp. 1953.
- ⁷⁷ *E. Vischer* und *E. Chargaff*, J. Biol. Chem. **168**, 781 (1947); **176**, 703 (1948).
- ⁷⁸ *R. D. Hotchkiss*, J. Biol. Chem. **175**, 315 (1948).
- ⁷⁹ *R. Markham* und *J. D. Smith*, Nature **163**, 250 (1949).
- ⁸⁰ *R. Markham* und *J. D. Smith*, Biochemic. J. **45**, 294 (1949).

- ⁸¹ *J. D. Smith* und *R. Markham*, *Biochemic. J.* **46**, 509 (1950).
⁸² *R. Markham* und *J. D. Smith*, *Biochemic. J.* **46**, 513 (1950).
⁸³ *R. Markham* und *J. D. Smith*, *Biochemic. J.* **49**, 401 (1951).
⁸⁴ *C. E. Carter*, *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 1466 (1950).
⁸⁵ *N. M. Löfgren*, *Acta Chem. Scand.* **6**, 1030 (1952).
⁸⁶ *R. Munier* und *M. Macheboeuf*, *Bull. soc. chim. biol.* **32**, 904 (1950).
⁸⁷ *R. Munier*, *Bull. soc. chim. France V*, **19**, 857 (1952).
⁸⁸ *L. Kogan*, *F. J. DiCarlo* und *W. E. Maynard*, *Analyt. Chemistry* **25**,
1118 (1953).
⁸⁹ *Th. Wieland* und *L. Bauer*, *Angew. Chem.* **63**, 511 (1951).
⁹⁰ *K. Dinroth*, *L. Jaenicke* und *I. Vollbrechtshausen*, *Z. physiol. Chem.* **289**,
71 (1952).
⁹¹ *A. R. Ghosh* und *D. P. Burma*, *Science and Culture (India)* **19**, 103
(1953).
⁹² *D. P. Burma*, *Science* **118**, 694 (1953).
⁹³ *W. C. Werkheiser* und *R. J. Winzler*, *J. Biol. Chem.* **204**, 971 (1953).
⁹⁴ *E. Scholz* und *P. Hagedorn*, *Dtsch. Apothek.-Ztg.* **93**, 81 (1953).
⁹⁵ *E. R. Holiday* und *E. A. Johnson*, *Nature* **163**, 216 (1949).
⁹⁶ *J. E. Edström*, *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 528 (1952).
⁹⁷ *H. Michl*, *Naturwiss.* **40**, 390 (1953).
⁹⁸ *R. M. Reguera* und *I. Asimov*, *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 5781 (1950).
⁹⁹ *R. Munier* und *M. Macheboeuf*, *Bull. soc. chim. biol.* **31**, 1144 (1949).
¹⁰⁰ *Y. Hashimoto* und *I. Mori*, *Nature* **170**, 1024 (1952).
¹⁰¹ *A. Bömer*, *A. Juckenack* und *J. Tillmans*, *Handbuch der Lebens-*
mittelchemie, Bd. VI, S. 114. Berlin: J. Springer. 1934.
¹⁰² *G. Klein*, *Handbuch der Pflanzenanalyse*, Bd. IV/1, S. 406—409.
Wien: J. Springer. 1933.
¹⁰³ *T. B. Johnson*, *Science* **85**, 431 (1937).
¹⁰⁴ Für die Überlassung der Guaranáproben sind wir *P. L. Hainberger*, S. J.,
Brasilien, zu großem Dank verpflichtet.
¹⁰⁵ Schreibweise gemäß *Handbuch der Lebensmittelchemie* (siehe Anm. 64),
S. 160.
¹⁰⁶ *Hoppe-Seyler/Thierfelder*, *Handbuch der physiologisch- und patho-*
logisch-chemischen Analyse für Ärzte und Studierende, 9. Aufl., S. 714.
Berlin: J. Springer. 1924. — *M. Krüger* und *J. Schmid*, *Z. physiol. Chem.* **45**,
1 (1905).
¹⁰⁷ *Hoppe-Seyler/Thierfelder*, *Handbuch der physiologisch- und patho-*
logisch-chemischen Analyse für Ärzte und Studierende, 9. Aufl., S. 875.
Berlin: J. Springer. 1924. — *A. Kossel*, *Z. physiol. Chem.* **6**, 426; **7**, 17 (1882).
¹⁰⁸ *H. Michl*, *Mh. Chem.* **83**, 737 (1952).
¹⁰⁹ *T. M. Lowry* und *W. V. Lloyd*, *J. Chem. Soc. London* **1932**, 1633.
¹¹⁰ *K. Schlögl* und *A. Siegel*, *Z. physiol. Chem.* **292**, 263 (1953).
¹¹¹ *G. Zimmermann* und *K. Nehring*, *Angew. Chem.* **63**, 556 (1951).
¹¹² *G. Denigès*, *Bull. trav. soc. pharmac.* **72**, 345 (1934); *Chem. Zbl.* **1935 I**,
3162.
¹¹³ *A. Barreto*, *Rev. quím. ind.* **13**, Nr. 151, 16 (1944); *Chem. Abstr.* **39**,
3123⁸ (1945).
¹¹⁴ *C. Graebe*, *Ann. Chem.* **263**, 24 (1891).
¹¹⁵ *I. I. Geschwind* und *C. H. Li*, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 834 (1952).
¹¹⁶ *G. Bertrand* und *P. de B. Carneiro*, *C. r. acad. sci., Paris* **193**, 276
(1931).
¹¹⁷ *F. Schmidt*, *O. Guaraná*. Rio de Janeiro. 1941.
¹¹⁸ *G. Bertrand* und *P. de B. Carneiro*, *C. r. acad. sci., Paris* **194**, 26 (1932).