

Über quantitative Mikrosublimation von Coffein und Theobromin und die Alkaloidbestimmung bei Purindrogen.

Von der

Eidgenössischen Technischen Hochschule
in Zürich

zur Erlangung der

Würde eines Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte

Nr. 339.

Promotionsarbeit

vorgelegt von

Hans Armin Oehrli, dipl. Apotheker

aus **Matten bei Interlaken**.

Referent: Herr Prof. Dr. R. Eder.

Korreferent: Herr Prof. Dr. W. D. Treadwell.

Weida i. Thür. 1923.

Druck von Thomas & Hubert.
Spezialdruckerei für Dissertationen.

Leer - Vide - Empty

Die vorliegende Arbeit wurde im pharmazeutisch-chemischen
Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule in
Zürich ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. R. Eder,

für die Anregung und die wohlwollende Unterstützung dieser
Arbeit den herzlichsten Dank auszusprechen.

Leer - Vide - Empty

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Einleitung	7
A. Übersicht über bisherige Methoden der Bestimmung von Coffein und Theobromin	9
I. Allgemeine und spezielle Coffeinbestimmungsmethoden und ihre Anwendung auf Tee, Kaffee, Mate, Kola, Guarana	9
1a. Direkte gravimetrische Bestimmung	11
a) Methoden, bei denen die Extraktion durch Wasser erfolgt 11	
Hilger - Juckenack; Hilger - Juckenack - Wimmer; Forster-Riechelmann; Bertrand; Balland; Tatlock und Thomsen; Costes. Americ. Assay of Agricult. Chemists.	
b) Methoden, bei denen die Extraktion durch organische Salzlösungen erfolgt	16
Herlant und Kreutz.	
c) Methoden, bei denen die Extraktion durch organische Lösungsmittel erfolgt	16
Paul - Cownley; Grandval - Lajoux; Keller; Siedler; Beitter; Keller-Beitter-Fromme (Pharmacopoea Helvetica, Ed. IV); Katz; Büttenberg; Waentig; Reinsch; Amerikanische Pharmakopoe-Methode für Guarana (U.S.P. IX); Léger (Cod. medicam., Ed. 1908); Wolf; Gorter; Lendrich-Nottbohm; Virchow; Fendler - Stüber; Deuß - van Romburgh - Nanninga; Vauthier; Power - Chesnut.	
d) Methoden, bei denen zur Extraktion resp. Reinigung die Sublimation benutzt wird	29
Ugarte; Burmann; Philipp.	
1b. Indirekte gravimetrische Bestimmung	33
Azadian.	
2. Titrimetrische Bestimmungsmethoden	33
a) Kjeldahlbestimmung	33
b) Jodometrische Bestimmung	34
c) Elektrotitrimetrische Bestimmung	34
3. Refraktometrische Bestimmung	34
4. Spektrographische Mikrobestimmung	35
5. Biologische Mikrobestimmung	35

	Seite
II. Methoden der Coffein- und Theobrominbestimmung in Kakao . . .	35
1. Gravimetrische Bestimmung	36
Prochnow; Camilla-Pertusi; Savini; Débourdeaux; Wadsworth; Ugarte.	
2. Titrimetrische Bestimmung	40
a) Kjeldahlbestimmung	40
b) Jodometrische Bestimmung	40
c) Elektrotitrimetrische Bestimmung	41
III. Zusammenfassende Beurteilung der bisherigen makrochemischen Coffein- und Theobromin-Bestimmungsmethoden	41
B. Neue gravimetrische Mikrobestimmungsmethode für Coffein und Coffein-Theobromin in Drogen	44
I. Apparatur zur quantitativen Mikrosublimation und Sublimations- verhältnisse von Coffein und Theobromin	45
II. Anwendung der gravimetrischen Mikromethode auf Drogen	54
1. Tee	56
2. Kaffee	62
3. Mate	65
4. Kola	69
5. Guarana	70
6. Kakao	73
III. Zusammenfassende Bemerkungen zu den vorstehenden Mikro- bestimmungsmethoden	76
C. Zusammenfassung	79
Literatur	80

Einleitung.

Während der qualitative Nachweis möglichst geringer Mengen chemischer Stoffe schon älteren Datums ist (Spektralanalyse, mikroskopische Nachweise), sind quantitative Mikrobestimmungsmethoden erst in neuerer Zeit zur Ausbildung gekommen. Außer der Substanzökonomie und der Zeitersparnis haben zu diesem Vorgehen Probleme gedrängt, zu deren Lösung man darauf angewiesen ist, Methoden kleinen und kleinsten Mengen anzupassen. In der Biochemie, und speziell in der medizinischen, ist man, weil die chemische Analytik z. T. versagte, zur quantitativen Wertung des Tierversuches fortgeschritten (Folia Digitalis, Secale cornutum usw.). Die Mikrochemie der Pflanze ist in qualitativer Hinsicht schon ziemlich weit ausgebaut worden. Ich erinnere an die zusammenfassenden Werke von Tunmann⁸⁷ und Molisch⁶¹ Quantitative mikrochemische Bestimmungsmethoden sind für pflanzliche Objekte erst in sehr geringer Anzahl zur Ausbildung gekommen. Im Sondergebiet der Alkaloidchemie sind makrochemische, quantitative Bestimmungsmethoden infolge ihrer praktischen Bedeutung schon weitgehend durchgearbeitet. Pflanzenphysiologische Gesichtspunkte lassen es wünschenswert erscheinen, chemisch wohl definierte Substanzen, wie die Alkaloide, in einzelnen Organen einer Pflanze zu bestimmen. Ein Vordringen bis zum Erforschen des Chemismus einer Zelle liegt allerdings noch weit ab. Man hat sich bei der erwähnten Aufgabe vor der Verfeinerung der Methoden bis vor kurzem so beholfen, daß man Alkaloidbestimmungen an durch Auswahl zusammengelegtem Material, z. B. bei einer Anzahl Colchicum-Samen, vorgenommen und alsdann den Gehalt des einzelnen Samens berechnet hat³⁷. In neuerer Zeit führt Rosenthaler^{76; 77} Gehaltsbestimmungen an einzelnen

Teilen einer Pflanze durch und benutzt die erhaltenen Daten zu variationsstatistischen Zwecken (Amygdalingehalt einer Mandel, Alkaloidgehalt eines Areca-, Calabar-, Cola-, Strychnos-Samens): Bei diesen Untersuchungen handelt es sich zumeist um Titrations-ergebnisse. Kolorimetrisch und nephelometrisch ist ebenfalls schon versucht worden, mikrochemisch Alkaloide zu bestimmen (Vergleichung der Alkaloidfällung durch Kiesel-Wolframsäure⁴, kolorimetrische Vergleichsbestimmungen mit Erdmannschem Reagens¹²).

Gravimetrische Methoden sind bis jetzt auf diesem Gebiete noch nicht in Anwendung gekommen. Von praktischer Bedeutung ist die gravimetrische Ermittlung kleiner Mengen solcher Pflanzenbasen, die infolge ihrer schwachen Basizität sich titrimetrisch nicht bestimmen lassen. Solche Alkaloide sind die Xanthinderivate Coffein und Theobromin, die als Dominanten eine ganze Gruppe von Drogen einheitlich haben zusammenfassen lassen (Tee, Kaffee, Mate, Kola, Guarana, Kakao und Ilex vomitoria). In der Kuhlmannschen Mikrowage verfügen wir über ein Instrument, welches uns gestattet, geringe Substanzenmengen in einfacher Weise zur Wägung zu bringen, wenn natürlich auch die untere Grenze derjenigen Mengen, die man bestimmen möchte, noch nicht erreicht werden kann. Die erwähnte Wage gestattet noch Mengen von 1 mgr mit großer Genauigkeit zu bestimmen. In den Meßbereich von 1—10 mgr fällt z. B. der Coffeingehalt einer einzelnen Kaffeebohne. Unterhalb 1 mgr werden die Fehler schon reichlich groß, und Bestimmungsmethoden für solche Mengen müssen erst noch ausgearbeitet werden.

Die nachfolgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Ausarbeitung einer Mikromethode zur gravimetrischen Bestimmung kleiner Mengen Coffein und Theobromin.

A. Übersicht über bisherige Methoden der Bestimmung von Coffein und Theobromin.

Es erschien zweckmäßig, vor der beabsichtigten Ausarbeitung einer gravimetrischen Mikrobestimmungsmethode für Coffein und Theobromin sich über die bisherigen, bereits weitgehend ausgebauten Makrobestimmungsmethoden einläßlich zu orientieren, um Erfahrungen in geeigneter Weise verwerten zu können.

I. Allgemeine und spezielle Coffeinbestimmungsmethoden und ihre Anwendung auf Tee, Kaffee, Mate, Kola, Guarana.

Die quantitative Ermittlung von Coffein läßt sich auf verschiedenen Prinzipien aufbauen. Folgende können unterschieden werden:

- 1a. gravimetrische, direkte Bestimmung;
- 1b. gravimetrische, indirekte Bestimmung;
2. titrimetrische Bestimmung:
 - a) N-Bestimmung nach Kjeldahl,
 - b) jodometrisches Verfahren,
 - c) elektrotitrimetrisches Verfahren;
3. refraktometrische Bestimmung;
4. spektrographische Bestimmung;
5. biologische Ausmittelung;
6. nephelometrische Methode;
7. kolorimetrische Methode.

Es soll gleich bemerkt werden, daß die beiden zuletzt genannten Prinzipien bei Drogen bis jetzt noch nicht angewendet worden sind. Als nephelometrische Bestimmungsmöglichkeit kommt z. B. die Fällung durch Kiesel- oder Phosphor-Wolframsäure in Betracht. Zur Bestimmung von Purinderivaten (Harnsäure usw.) in Harn und Blut haben bereits Graves-Kober³⁶ eine solche Methode ausgearbeitet. Eine kolorimetrische Ausarbeitung der Murexidreaktion dürfte wohl keine Aussicht auf Erfolg haben, da die Intensität dieser Farbreaktion von zu vielen Faktoren abhängt.

Im folgenden sollen die wesentlichsten Bestimmungsmethoden und ihre Beziehungen untereinander kurz angeführt werden. Ein strenges Festhalten an obiger Einteilung ist dabei nicht möglich, da sehr oft gravimetrische Resultate durch Kjeldahlbestimmungen kontrolliert werden. Eine Betrachtung für sich erfordern die Theobrominbestimmungsmethoden in Samen Kakao, in welchem diese Base vorherrscht. Bei den Purindrogen Kola und Mate kann die geringe Menge Theobromin meistens vernachlässigt werden, so daß es sich in diesen Fällen im wesentlichen um Coffeinbestimmungen handelt. Da die Chemie der Purindrogen erst sehr mangelhaft aufgeklärt ist, z. B. hinsichtlich der Natur der in den Pflanzen und Drogen vorkommenden Coffeinverbindungen, so kann man bei der Ausarbeitung der Bestimmungsmethoden für die Purinbasen in solchen Objekten oft nur rein empirisch vorgehen. Methoden, die für eine Purindroge ausgearbeitet wurden, können in vielen Fällen nicht ohne weiteres auf andere Drogen übertragen werden.

Wie intensiv die Frage der quantitativen Bestimmung der Purinbasen bearbeitet worden ist, ergibt sich daraus, daß bereits 1890 und 1897 zusammenfassende Übersichten^{43; 86} der bis zu diesen Zeiten erschienenen Arbeiten notwendig geworden sind. Eine Liste dieser älteren Arbeiten ist in der vorliegenden Publikation hinten unter den Literaturnachweisen gesondert zusammengestellt.

Von den älteren Methoden haben sich einzig diejenigen von Paul-Cownley⁶⁶ und Grandval-Lajoux³⁵ bis in die Neuzeit

erhalten. Es sollen daher im nachfolgenden von den vor 1897 publizierten Methoden nur diese zwei einläßlich besprochen werden.

Nach Lendrich-Nottbohm⁵⁸ lassen sich die gravimetrischen und titrimetrischen Bestimmungen in verschiedene Gruppen einteilen, je nach der für die Alkaloide verwendeten Extraktionsmethode. Die Extraktion kann vorgenommen werden mit oder ohne Zuhilfenahme von Aufschließungsmitteln. In vielen Fällen erweist es sich nämlich als notwendig, die Basen zuerst aus den komplizierten Verbindungen, wie sie in den Pflanzen vorkommen, abzuspalten, bevor man eine Extraktion vornehmen kann (Vorbehandlung mit Wasser, Ammoniak, verdünnter Schwefelsäure usw). Als Extraktionsmittel kommen die folgenden in Betracht:

- a) Wasser,
- b) organische Salzlösungen,
- c) organische Lösungsmittel.

Diesen drei Gruppen läßt sich als vierte neu zufügen:

- d) die Extraktion durch Sublimation.

In dieser Gruppe sollen auch diejenigen Methoden erwähnt werden, welche dem Extraktionsmodus nach in die Gruppe a oder c gehören, bei denen aber während des Isolierungsprozesses eine Sublimation vorgenommen wird.

1a. Direkte gravimetrische Bestimmung.

- a) Methoden, bei denen die Extraktion des Coffeins durch Wasser erfolgt.

In der Gruppe der Wasserbehandlungsmethoden sind im Jahre 1897 zwei Coffeinbestimmungsmethoden entwickelt worden, diejenigen von Hilger-Jückenack⁴⁴ und Forster-Riechelmann²⁷, die noch jetzt in allen Lehr- und Handbüchern der Lebensmittelchemie mitgenommen werden, trotzdem ihre Mängel sich bei vergleichenden Untersuchungen bald bemerkbar gemacht haben.

Hilger und Juckenack gehen folgendermaßen vor: 20 g fein zerriebener Tee oder Kaffee werden mit 900 g Wasser bei Zimmertemperatur in einem geräumigen Becherglas einige Stunden aufgeweicht und dann unter Ersatz des verdunsteten Wassers vollständig ausgekocht, wozu bei Rohkaffee drei Stunden, bei geröstetem $1\frac{1}{2}$ Stunden notwendig sind. Man läßt auf $60-80^{\circ}$ erkalten, setzt 75 g einer 7—8%igen Lösung von basischem Aluminiumacetat und alsdann unter Umrühren 1,9 g Natriumkarbonat hinzu, kocht nochmals etwa 5 Minuten und bringt das Gesamtgewicht auf 1020 g. Nach dem Filtrieren werden 750 g des völlig klaren Filtrates, entsprechend 15 g Ausgangssubstanz, mit 10 g frisch gefälltem Aluminiumhydroxyd und etwas Filtrierpapierbrei unter zeitweiligem Umrühren auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wird im Wassertrockenschrank vollständig getrocknet und im Soxhletschen Extraktionsapparat 8—10 Stunden mit reinem Tetrachlorkohlenstoff ausgezogen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird das zurückgebliebene Coffein im Wassertrockenschrank getrocknet und gewogen.

Das Verfahren liefert nach einer Kritik Gadamers³⁰ und Waentigs⁹⁵ zu niedrige und überdies untereinander wenig übereinstimmende Resultate. Die Fehlerquellen sucht Gadamer in der Unmöglichkeit, durch einmaliges Auskochen mit Wasser alles Coffein zu entziehen, während sie in Wirklichkeit nach den Untersuchungen von Lendrich-Murfield⁵⁷ darin zu suchen ist, daß einem staubtrockenen Pulver bei der Extraktion mit Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff ohne Wasserzusatz infolge Absorption die Base nicht vollständig entzogen werden kann. Ein von Wimmer⁹⁹ modifiziertes Verfahren nach Hilger-Juckenack berücksichtigt diesen Umstand:

20 g fein gemahlener Kaffee werden in einem tarierten Emailtopf mit 900 g Wasser übergossen und bei geröstetem Kaffee eine Stunde unter Ersatz des verdampfenden Wassers aufgeköcht. Man läßt etwas erkalten, fügt unter Umrühren 75 g einer 7,5—8%igen Lösung von basischem Aluminiumacetat und hierauf 1,5 g Natriumkarbonat hinzu. Man bringt das Gesamtgewicht auf 1020 g, filtriert und dampft 750 g (= 15 g Kaffee) des klaren Filtrates ein. Bei Syrupkonsistenz fügt man 11 g gefälltes Aluminiumhydroxyd und etwas feinen Sand hinzu, verrührt gleichmäßig und dampft weiter auf dem Wasserbad bis zur Trockne ein. Den Rückstand kratzt man aus der Schale und bringt ihn quantitativ in eine Extraktionshülse. Den letzten Rest des Extraktes bringt man mit etwas feuchter Watte ebenfalls in die Papierhülse. Die Feuchtigkeit der Watte genügt, um eine quantitative Erschöpfung zu ermöglichen. Man extrahiert 8—10 Stunden mit Tetrachlorkohlenstoff, gießt quantitativ in einen Kjeldahlschen Kolben, destilliert ab und bestimmt den Stickstoff nach Kjeldahl. $1\text{ cm}^3 \frac{N}{4}\text{-H}_2\text{SO}_4$ entspricht 0,01216 g wasserfreiem Coffein.

Die Methode ist meines Wissens noch nicht überprüft worden. Es ist gegen dieselbe einzuwenden, daß nach den Angaben von Power-Chesnut⁶⁹ beim Eindampfen alkalischer Coffeinlösungen die Base als solche z. T. zerstört wird. Die Genannten verloren beim Eindampfen von 0,2003 g Coffein in 100 cm³ Wasser mit 10 g Magnesia usta ponderosa, die 13,9% Soda enthielt, 5% der Base. Emil Fischer²⁴ zeigte, daß bei 1/4-stündigem Erhitzen auf 100° von 2 g Coffein mit 20 cm³ n-Natronlauge sämtliches Alkaloid zerstört wird. Daraus ergibt sich, daß ein Eindampfen oder Kochen von Coffeinlösungen bei Gegenwart erheblicher Alkalimengen nicht zulässig ist.

Forster-Riechelmann²⁷ veröffentlichen folgendes Verfahren:

20 g gemahlener Kaffee werden viermal mit Wasser aufgeköcht. Die Gesamtmenge der Flüssigkeit wird auf 1000 cm³ gebracht. Nach dem Filtrieren werden 600 cm³ in einem dazu konstruierten Extraktionsapparat mit Natronlauge alkalisch gemacht und 10 Stunden mit Chloroform ausgezogen. Der Auszug wird in einem Kjeldahl-Kolben vom Lösungsmittel befreit und eine Stickstoffbestimmung ausgeführt. Aus dem Stickstoffgehalt wird durch Multiplikation mit dem Faktor 3,464 das wasserfreie Coffein errechnet. Der nach diesem Verfahren bestimmte Coffeingehalt wird etwas zu hoch gefunden, da im Kaffee außer Coffein noch kleine Mengen Theophyllin enthalten sein sollen.

Bei vergleichenden Untersuchungen erhält man zu hohe Resultate. Der Zusatz von Natronlauge ist infolge der hohen Empfindlichkeit des Coffeins diesem Agens gegenüber nicht ohne Bedenken.

Bertrand⁸ veröffentlichte 1902 eine Bestimmungsmethode, die weiter keine großen Modifikationen aufweist:

10 g der fein gepulverten Droge (Tee, Kaffee, Mate) werden 10 Minuten mit 100 cm³ Wasser gekocht. Man läßt absetzen und dekantiert in einen geeichten 500 cm³-Kolben. Der Vorgang wird dreimal wiederholt. Die Auszüge werden vereinigt. Man fällt mit Bleiessig in leichtem Überschuß, ergänzt auf 500 cm³, filtriert 400 cm³ ab, fällt das Blei mit verdünnter Schwefelsäure in leichtem Überschuß aus und filtriert. Man wäscht Niederschlag und Filter aus, konzentriert die Lösung im Vakuum bis auf 30 cm³, filtriert in einen Schüttelrichter und wäscht nach, so das 40—50 cm³ Flüssigkeit erhalten werden. Man schüttelt vier- bis fünfmal mit je 50 cm³ Chloroform aus, vereinigt und filtriert, destilliert ab und wägt das wasserfreie Coffein.

Das Verfahren steht demjenigen von Hilger-Juckenack am nächsten und weist theoretisch keine Mängel auf. Die Ausschüttelung ist reichlich bemessen.

Balland³ gibt ein Wasser-Soda-Verfahren bekannt, das mit einer Kompensation der Verluste durch Verunreinigungen rechnet.

Das folgende, von Tatlock und Thomsen⁸⁴ stammende Verfahren weist wieder engere Beziehungen zum Forster-Riechelmanschen Verfahren auf:

6 g Kaffee werden mit 600 cm³ Wasser oder 2 g Tee mit 800 cm³ Wasser zwei Stunden resp. eine Stunde am Rückflußkühler gekocht, ein aliquoter Teil, 500 cm³ entsprechend 5 g Kaffee, oder das Ganze filtriert (bei Tee nach Auswaschen des Rückstandes mit heißem Wasser) und auf 40 cm³ eingedampft. Die sirupöse Lösung wird mit 10 cm³ n-Natronlauge oder Ammoniak versetzt, unter Nachspülen in einen Scheidetrichter übergeführt und mit 40 + 30 + 10 cm³ Chloroform dreimal ausgeschüttelt. Die gefärbte Chloroformlösung wird mit 10 cm³ n-Natronlauge und weiterhin mit 10 cm³ Wasser durchgeschüttelt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand getrocknet und gewogen.

Costes¹⁴ verwendet zur Coffeinbestimmung in coffeinarmem Kaffee zur Zerstörung gewisser Extraktivstoffe konz. Schwefelsäure, indem er nachweist, daß dieselbe, in großem Überschuß mit dem Alkaloid erwärmt (während drei Stunden auf 100°), letzteres nicht zerstört. Er geht folgendermaßen vor:

20 g coffeinarmen Kaffee oder 50 g natürlicher Kaffee werden unter Umrühren portionenweise mit 15—20 cm³ resp. 5 cm³ konz. Schwefelsäure versetzt, und 10—15 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt. Man gibt 200 cm³ siedendes Wasser hinzu und filtriert in eine zur Neutralisation der Säure ungenügende Menge Natronlauge. Filter und Rückstand werden 5 Minuten mit 100 cm³ siedendem Wasser weiter ausgekocht und zum ersten Filtrat filtriert. Das Auskochen mit 100 cm³ Wasser wird wiederholt. Die vereinigten Filtrate werden mit Soda alkalisch gemacht und auf ca. 200 cm³ über freiem Feuer eingedampft. Man schüttelt die eventl. filtrierte Lösung mit 50, 35 und 30 cm³ Chloroform aus, destilliert bis auf 3—4 cm³ ab und gießt unter Nachspülen in eine Glasschale. Man reinigt das Coffein durch erneutes Zufügen von 2 cm³ konz. Schwefelsäure unter Erwärmen während 10 Minuten auf dem Wasserbad. Man gibt vorsichtig so viel Wasser hinzu, um durch ein kleines, glattes Filterchen filtrieren zu können, wäscht fünf- bis sechsmal mit sehr wenig siedendem Wasser nach und neutralisiert schwach mit Ammoniak. Die Lösung wird dreimal mit 25, 20 und 15 cm³ Chloroform erschöpft und das Lösungsmittel aus der gewogenen Glasschale vorsichtig abgedampft. Beim Verdampfen der letzten Anteile empfiehlt sich die Zwischenschaltung eines Korkstückes

zwischen Wasserbad und Glasschale. Das Coffein wird auf dem siedenden Wasserbad während $\frac{1}{2}$ Stunde getrocknet und alsdann gewogen. Zu Expertisenanalysen empfiehlt sich eine Stickstoffkontrolle, während zu Industrieanalysen die erste Säurelösung einfach mit massiven Mengen Chloroform (100, 100, 75 cm³) ausgeschüttelt wird. Für „coffeinfreien“ Kaffee (mit 0,1 % oder weniger Coffein) soll eine größere Menge Ausgangsmaterial genommen werden. Jedes noch so rein aussehende, nach irgend einer Methode isolierte Alkaloid, soll nach Costes nur 90—93 % reines Coffein aufweisen.

Die Methode ist von Schmidt⁶⁰ in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden aufgenommen worden. Theoretisch ist dazu zu bemerken, daß es nicht angeht, eine mit Soda alkalisch gemachte Coffeinlösung schonungslos über freiem Feuer einzudampfen. Es ergibt sich dies auch aus der Übereinstimmung des Expertisenresultats mit demjenigen nach Hilger-Juckenack, das ja ebenfalls eine Verlustquelle aufweist.

Zur Bestimmung des Coffeins in Tee und Kaffee ist in Abänderung der Verfahren von Stahlschmidt und von Dekker¹⁶ sowie von Power und Chesnut⁶⁹ folgende Methode publiziert worden (Americ. Assay of Agricult. Chemists¹).

Die Droge wird zerkleinert und durch Sieb 9 U.S.Ph. IX. geschlagen. 5 g Pulver werden in einem geeichten 500 cm³-Kolben unter Rückfluß mit 10 g Magnesia usta ponderosa und 200 cm³ Wasser zwei Stunden in leichtem Sieden erhalten. Man füllt nach Erkalten auf 500 cm³ auf, filtriert und dampft 300 cm³ unter Zusatz von 10 cm³ 10 %iger Schwefelsäure durch schwaches Kochen auf 100 cm³ ein. Man filtriert in einen Scheidetrichter und wäscht mit 1 %iger Schwefelsäure nach. Die saure Lösung wird sechsmal mit Chloroform ausgeschüttelt (mit 25, 20, 15 cm³, dreimal mit je 10 cm³). Die vereinigten Chloroformlösungen werden in einem zweiten Scheidetrichter mit 5 cm³ 1 % Kalilauge geschüttelt. Die Chloroformlösung wird in einem tarierten Kolben abgelassen und die alkalische Lösung noch zweimal mit je 10 cm³ Chloroform nachgewaschen. Die Chloroformlösung wird abdestilliert und das Coffein bei 100° bis zur Konstanz getrocknet und gewogen.

Eine Nachprüfung des Verfahrens ist meines Wissens bis jetzt nicht erfolgt. Es wird eine Magnesia usta pond. verwendet, wie solche durch Glühen eines feuchten, basischen Magnesiumkarbonates erhalten wird. Dieselbe ist von Wasser schwer benetzbar; sie darf keine Soda enthalten, ansonst Coffein bei diesem Modus der Aufspaltung teilweise zerstört wird (vide Mate-Analyse). Theoretisch ist sie richtig, wenn kein Theobromin mit bestimmt werden soll (Kola, Mate).

b) Methoden, bei denen die Extraktion des Coffeins durch organische Salzlösungen erfolgt.

Zur Extraktion von Coffein können Lösungen von Natrium benzoicum und Natrium salicylicum⁴¹ verwendet werden, sowie Chloral-Alkoholat⁵⁵ bei Theobrominbestimmungen in Kakao. Praktische Bedeutung haben diese Verfahren nicht erlangt.

c) Methoden, bei denen die Extraktion des Coffeins durch organische Lösungsmittel erfolgt.

In dieser Gruppe sind als älteste Verfahren, die in neuerer Zeit noch angewendet werden, diejenigen von Paul-Cownley⁶⁶ und Grandval-Lajoux³⁵ zu nennen.

Erstere mischen in einem Mörser 5 g fein gepulverten Tee mit 2 g fein gepulverter Magnesia und durchfeuchten das Ganze mit heißem Wasser. Die Masse wird verrieben und bei 100° getrocknet. Man extrahiert die Masse mit heißem Alkohol. Das resultierende Filtrat wird bis fast zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit 50 cm³ heißem Wasser unter Zusatz einiger Tropfen verdünnter Schwefelsäure aufgenommen. Die erkaltete Lösung wird filtriert und wiederholt mit Chloroform bis zur Erschöpfung ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformlösungen werden zur Entfernung der Farbstoffe mit sehr verdünnter Natronlauge behandelt und abdestilliert. Der Rückstand wird gewogen.

Grandval und Lajoux³⁵ gehen ähnlich vor:

5 g gemahlener Röstkaffee werden mit einer durchgeschüttelten Menge von 5 g Äther und 1 g Ammoniak gleichmäßig befeuchtet, bis zur Pulvrigkeit verrieben und mit 50 cm³ Chloroform am Rückflußkühler extrahiert. Der nach dem Abdestillieren verbleibende, trockene Rückstand wird mit 1 cm³ n-Schwefelsäure versetzt und nach kurzem Einwirken fünf- bis sechsmal mit kleinen Mengen siedenden Wassers erschöpft. Man dampft die vereinigten Filtrate nach Übersättigen mit Ammoniak zur Trockene ein und nimmt den trockenen Rückstand mit Chloroform auf. Das nach dem Filtrieren und Abdunsten verbleibende Coffein stellt ein wenig gefärbtes Rohcoffein dar, dessen genauen Wert man durch eine Kjeldahlbestimmung ermittelt.

Weil⁹⁶ lobt das Verfahren und hat bei vergleichenden Untersuchungen nach Lendrich-Nottbohm übereinstimmende Resultate erhalten.

Das Verfahren von C. C. Keller⁵⁰ hat infolge seiner Einfachheit eine Zeitlang erhebliches Interesse beansprucht und ist zum Ausgangspunkt einer Reihe weiterer Verfahren geworden. Dasselbe bezieht sich auf die Ermittlung des Coffeingehaltes im

Tee und ist in der Folge von anderen Autoren auf die übrigen Purindrogen übertragen worden. Keller lehnt sich an die 1895 von Socolof (vide „Ältere Literatur“) ausgearbeitete Methodik an, nach welcher schwach feuchter Tee mit Ammoniak behandelt und mit Chloroform extrahiert wird. Die Vorzüge des Kellerschen Vorgehens liegen im Abgießen eines aliquoten Teiles der nach längerem Stehen klar gewordenen Chloroformlösung und einer einfachen Umkristallisation des nach Abdestillieren des Chloroforms zurückbleibenden Rohcaffeins mit verdünntem Alkohol.

Kellersches Verfahren:

In einen weithalsigen Scheidetrichter gibt man 6 g unzerkleinerte, getrocknete Teeblätter und übergießt mit 120 g Chloroform. Nach einigen Minuten, nachdem das Chloroform den Tee durchtränkt hat, fügt man 6 cm³ 10 %igen Ammoniak hinzu und schüttelt während einer Viertelstunde. Man wartet 5—6 Stunden bis zum Klarwerden der Lösung, gießt 100,0 g derselben durch ein kleines, mit Chloroform benetztes Filterchen in ein Kölbchen und destilliert auf dem Wasserbade ab. Der Rückstand wird mit 3—4 cm³ absoluten Alkohols aufgenommen und dieser auf dem Wasserbad zur völligen Vertreibung des Chloroforms abdestilliert. Zur Reinigung von Fett, Wachs und Chlorophyll übergießt man den Inhalt auf dem Wasserbad mit einer Mischung von 7 cm³ Wasser und 3 cm³ Alkohol, worauf das Coffein beim Umschwenken fast momentan in Lösung geht. Dann gibt man noch 20 cm³ Wasser hinzu, verschließt das Kölbchen und schüttelt kräftig, wobei das Chlorophyll sich zusammenballt. Die Lösung wird durch ein kleines, mit Wasser benetztes Filter gegossen und Filter und Kölbchen werden mit 10 cm³ Wasser nachgespült; das Filtrat wird in einer tarierten Glasschale verdampft und das Coffein nach einstündigem Trocknen im Wassertrockenschrank gewogen.

Gadamer³⁰ hat das Kellersche Verfahren mit demjenigen von Hilger-Juckenack verglichen und letzteres fehlerhaft gefunden, wie dies die folgenden Analysen illustrieren:

Coffein in Prozenten in Tee.

C. C. Keller		Hilger-Juckenack	
gewogen	Kjeldahl	gewogen	Kjeldahl
3,026	3,01	2,794	2,174
3,010	3,008	2,46	2,20
3,014	—	2,24	—
3,020	—	2,43	2,19
—	—	2,45	2,19

Oehrli.

Der Reinheit des nach Keller erhaltenen Coffeins wurde zudem noch durch Darstellung und Analyse des Goldsalzes nachgewiesen.

Gadamer findet die Kellersche Methode auch für gerösteten Kaffee anwendbar. Siedler⁸¹ überträgt dieselbe 1898 auf rohen Kaffee und nimmt dabei zuerst eine Entfettung mittelst Petroläther vor, ohne jedoch für die durch denselben gelöste Menge Coffein eine Korrektur anzubringen. Die Keller-Siedlersche Methode ist in die zweite Auflage des schweizerischen Lebensmittelbuches aufgenommen worden.

Beitter⁶ zieht in einer Arbeit 1901 — ohne jedoch Zahlen zu geben — die alten Verfahren von Flückiger-Meyer²⁵, Karl Dietrich¹⁹ und das Kellersche Verfahren⁵⁰ in Betracht. Da gebrannter Kalk auf die Xanthinbasen zersetzend einwirkt (Ganse⁸¹), fallen bei beiden ersten Methoden weg. Dem Kellerschen Verfahren legt er eine Verlustquelle bei der Umkristallisation aus verdünntem Alkohol zur Last und ändert dieses dahin um, daß er den Rückstand mit Chloroform-Wasser aufnimmt, das organische Lösungsmittel wegkochen läßt und der erkalteten Lösung im Perforator von J. Alf. Mjoen das Coffein entzieht. Bei der Anwendung dieser abgeänderten Methodik für Mate, Tee und gebrannten Kaffee erhält der Autor geringe Färbungen des zur Wägung gelangenden Coffeins, die ihm unvermeidlich scheinen.

Von der Pharmacopoea Helvetica, Ed. IV, ist zur Bestimmung von Coffein in Semen Colae und Guarana das Verfahren von Keller-Beitter-Fromme⁵¹ aufgenommen worden.

7 g Droge (Cola oder Guaranapulver) werden mit 70 g Chloroform 10 Minuten durchgeschüttelt, dann 4 resp. 5 cm³ 10%iges Ammoniak zugegeben und während einer Stunde öfters kräftig geschüttelt. Man filtriert durch ein Faltenfilter unter Bedecken des Trichters und befreit 40 g des Filtrates völlig vom Lösungsmittel. Man gibt 2 cm³ Chloroform und 15 cm³ heißes Wasser hinzu, erhält bis zum völligen Verdampfen des Chloroforms im Sieden und filtriert durch ein Filterchen von 7 cm Durchmesser in ein tariertes Porzellanschälchen. Man wäscht dreimal mit je 10 cm³ siedendem Wasser nach und verdampft auf dem Wasserbad. Der Rückstand wird bei 100° getrocknet und gewogen.

Zur Bestimmung in Colafluidextrakt werden 8 g mit 3 g Magnesia usta während 10 Minuten auf dem Dampfbad erhitzt und mit 15 g Flußsand zur

Trockene gebracht. Das zerriebene Gemenge wird mit 80 g Chloroform während einer Stunde häufig und kräftig geschüttelt; 50 g der filtrierten Lösung werden wie bei Colapulver weiter behandelt.

Die Wasserlösung bei der Colabestimmung ist nicht klar filtrierbar, und das erhaltene Coffein sieht reichlich gefärbt aus. Das Aufspalten durch Ammoniak scheint ungenügend zu sein, da beim Eindampfen noch eine deutliche Abspaltung gerbstoffartiger Körper zu bemerken ist. Das Wägeresultat dieser Methode ist zwar überraschend gut. Rosenthaler⁷⁷ hat dieselbe zu seinen Untersuchungen über Colasamen benutzt.

Bei Guarana wird die Bestimmung schwer oder unausführbar, indem infolge des höheren Fettgehaltes eine Filtration der Wasserlösung sehr langsam vor sich geht. Die Wasserlösung ist stark trübe und die Abspaltung gerbstoffartiger Körper noch deutlicher wie bei Cola.

Katz⁴⁶ verbessert die Beittersche Bestimmung, bei welcher Schwierigkeiten in der Erreichung eines klaren Filtrates der Wasserlösung auftreten, indem er eine besser zu filtrierende Lösung in der Weise erzielt, daß er den nach Abdestillieren des Chloroforms verbleibenden Rückstand durch Übergießen und Abdampfen mit einigen Kubikzentimetern Äther vollständig vom ursprünglichen Lösungsmittel befreit, dann mit 0,5 % Salzsäure aufnimmt und aus dieser sauren Lösung — zur Vermeidung eines Fehlers der Dietrichschen Methode, bei welcher in der durch Ausschütteln gewonnenen Coffein-Chloroform-Lösung mit übergegangenes Ammoniumchlorid sich nachweisen läßt — durch Perforation im Katzschen Perforator die Base isoliert. Die Ausarbeitung der Denkschrift über Kaffee durch das Kaiserliche Gesundheitsamt veranlaßt den Autor⁴⁷, sein Verfahren für rohen und gebrannten Kaffee umzuarbeiten. Ursprünglich handelte es sich um die Ermittlung der Coffeinmengen im Kaffeeaufguß. Katz geht folgendermaßen vor:

10 g der pulverisierten Drogen werden mit 200 g Chloroform übergossen, 10 g 10%iges Ammoniak zugefügt, $\frac{1}{2}$ Stunde geschüttelt und ab-

sitzen gelassen. 150 g werden durch ein Sandersches⁷⁸ Zigarettenfilter*) abgossen; das Chloroform wird abdestilliert, 10 cm³ 0,5%iges HCl und einige Kubikzentimeter Äther, sowie 0,5 g festes Paraffin werden hinzugefügt; der Äther wird vorsichtig auf dem Wasserbad abgedampft und die Flüssigkeit bis zum Schmelzen des Paraffins erwärmt. Man läßt erkalten, gießt durch ein kleines, nasses Filter, behandelt den Rückstand zweimal mit je 10 cm³ 0,5% iger HCl unter jeweiligem Erwärmen und Erkaltenlassen und entzieht der Lösung im Katzschen Perforator mittelst Chloroform das Coffein. Das nach Abdestillieren des Chloroforms und Trocknen zurückbleibende Coffein wird als Rohcoffein gewogen. Zur Reinigung des Rohcoffeins wird dieses auf dem Wasserbad unter Zugabe einiger Tropfen Äther in 10 cm³ Wasser gelöst, der Äther abgedampft, die heiße Flüssigkeit mit 3 cm³ einer Aufschüttelung von Bleihydroxyd in Wasser 1 : 20 versetzt und weitere 10 Minuten erwärmt. Man fügt dem trüben Gemisch 0,2 g Magnesiumoxyd in der Wärme zu, läßt erkalten, filtriert und wäscht nach. Dem Filtrat wird im Katzschen Perforator mittelst Chloroform das Coffein entzogen, und die nur noch schwach gefärbte Base gewogen.

Büttenberg¹⁰ überträgt die Katzsche Methode auf Tee, bei welchem die Bleihydroxyd-Magnesiumoxyd-Reinigung unterbleiben kann. Die salzsaure Coffeinlösung wird vier- bis fünfmal mit je 20 ccm Chloroform ausgeschüttelt oder perforiert.

In einer Arbeit (Über den Gehalt des Kaffeegetränkes an Coffein) aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt unternimmt Percy Waentig⁹⁵ eine vergleichende Untersuchung über die von Hilger-Juckenack⁴⁴, Keller⁵⁰ und Katz⁴⁷ ausgearbeiteten Methoden. Er bestätigt im wesentlichen die Resultate von Katz, erreicht aber ein noch weniger gefärbtes Coffein, indem er sich die Erfahrung von Hilger-Juckenack zunutze macht, wonach mit reinem Tetrachlorkohlenstoff die am wenigsten gefärbten Lösungen erhalten werden.

*) Beim Sanderschen Zigarettenfilter handelt es sich um ein Filtrieren ohne Verdunsten. Die Apparatur ist einfach und funktioniert gut, wenn auch manchmal etwas langsam. Um eine auf der einen Seite schief abgeschnittene 10 cm lange Glasröhre mittlerer Dicke wird in der skizzierten Weise ein quadratisches Filter von 8 cm Seitenlänge aufgebunden und mit Kolben und Flasche verbunden. Durch Umstülpen erreicht man eine einfache Filtration. Die Flasche, in der die Droge mit dem Lösungsmittel behandelt wird, muß für 200 g Chloroform 400 cm³ halten und ist anderen Verhältnissen entsprechend anzupassen.

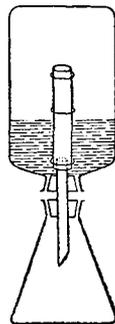


Fig. 1. Sandersches Zigarettenfilter.

Waentig arbeitet in der Weise, daß er den wäßrigen Kaffeeauszug eindampft, mit Ammoniak alkalisch macht, im Perforator mittelst Chloroform erschöpft, das gewonnene Rohcoffein der Bleihydroxyd-Reinigung nach Katz unterwirft und das zweite Mal nun die Lösung mittelst Tetrachlorkohlenstoff perforiert.

Als Kriterium für die Reinheit des erhaltenen Coffeins führt der Autor Schmelzpunktsbestimmungen aus, die in den folgenden Arbeiten in Betracht gezogen werden.

Die Befunde werden durch nachfolgende Analysen-Zahlen, die bei demselben Material nach den verschiedenen Methoden erhalten werden, illustriert:

Coffein in Prozenten in gerösteten Kaffee.

Keller	Hilger-Juckenack	Katz (1904)		Waentig-Katz	
		roh	rein	roh	rein
1,58	1,05	1,46	1,31	1,39	1,29
1,82	0,98	1,46	1,32	1,40	1,28
1,61	1,09	—	—	1,38	1,28
—	0,89	—	—	1,39	1,28
—	1,02	—	—	1,41	1,29
		Sdp. 225°		Sdp. 227°	
		Reines Coffein 228°			

Bei den Bestimmungen nach Keller arbeitet Waentig nach der ursprünglichen von C. C. Keller angegebenen Vorschrift, ohne vorerstige Entfettung, wie sie von Siedler angegeben worden ist. Das Hilger-Juckenacksche Verfahren liefert zu niedrige, das Kellersche zu hohe und ungleichmäßige Resultate, während Katz und Waentig innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmen. Das erhaltene Coffein ist ziemlich rein, allerdings nicht ganz weiß und weist einen Schmelzpunkt von 227° auf.

Reinsch⁷³ hat das Katzsche Verfahren ebenfalls nachgeprüft und als gut brauchbar befunden, will aber zur Kontrolle eine N-Bestimmung ausgeführt wissen. Der Codex aliment. Austr. verlangt denn dieselbe auch.

Die U.S.Ph.IX gibt für Guarana folgende Wertbestimmungsmethode, die sich auf das Vorgehen von Keller-Katz aufbaut und einige Abänderungen vornimmt.

6,0 g gepulverte (Nr. 60) Guarana werden in einer Flasche mit 120 cm³ Chloroform und 6 cm³ Ammoniak $\frac{1}{2}$ Stunde lang öfters geschüttelt und dann vier Stunden stehen gelassen. Man schüttelt abermals kräftig durch, gießt nach Absetzen der Droge durch einen Bausch gereinigter Watte und sammelt 100 cm³ Filtrat, 5 g Droge entsprechend. Das klare Filtrat wird vollständig zur Trockene gebracht und der Rückstand unter Anwendung gelinder Wärme in schwacher Schwefelsäure (ca. 2,5%) gelöst. Nach dem Abkühlen filtriert man in einen Scheidetrichter und wäscht mit wenig destilliertem Wasser wiederholt nach. Man übersättigt bis zur deutlich alkalischen Reaktion (Lackmus) mit Ammoniak und schüttelt vollständig mit Chloroform aus (Probe mit J₂ 1,0 + KJ 3,0 + H₂O 50,0 in schwefelsaurer Lösung). Die vereinigten Chloroformlösungen werden abgedunstet und der Rückstand wird bei 80° bis zur Konstanz getrocknet und gewogen.

Zur Bestimmung des Coffeins im Fluidextrakt der Guarana geht die U.S.Ph.IX ähnlich vor:

5 cm³ Fluidextrakt werden im Scheidetrichter mit 1 cm³ 10%igen Ammoniak versetzt und mit Chloroform vollständig ausgeschüttelt (Jodkali in saurer Lösung). Die vereinigten Lösungen werden zur Trockene gebracht und der Rückstand wird in 20 cm³ Wasser unter Erwärmen aufgelöst. Nach dem Abkühlen wird in einen Scheidetrichter filtriert und mit destilliertem Wasser nachgespült. Das Alkaloid wird erneut mit Chloroform vollständig ausgeschüttelt und nach Abdestillieren des Lösungsmittels bei 80° getrocknet und gewogen.

Es besteht bei dieser Methode die Gefahr, daß Ammonsalze spurenweise in das Chloroform übergehen. Bei 80° ist zudem Coffein schwer wasserfrei zu erhalten⁵⁸. Die neueste amerikanische Bestimmungsmethode¹ trocknet auch wieder bei 100°.

Léger⁵⁶ gibt 1903 ein Verfahren bekannt, das für Cola, Guarana, Tee und Kaffee brauchbar sein soll. Der Codex medicamentarius gallicus, Editio 1908, übernimmt dasselbe und läßt Coffein in Tee und Cola auf diese Weise bestimmen.

Die 15 g Trockensubstanz (bei 100° getrocknet) entsprechende Menge Teepulver wird in einem Mörser mit 5 g Magnesia usta und 10 cm³ Wasser gut gemischt und die feuchte, homogene Masse in einem 500 cm³-Kolben verkorkt zwei Stunden stehen gelassen. Man fügt 150 cm³ Chloroform hinzu, wägt Kolben mit Inhalt, erhitzt eine Stunde lang am Rückflußkühler auf dem Wasserbad, läßt erkalten und stellt das ursprüngliche Gewicht wieder her. Man mischt durch und filtriert durch ein Faltenfilter in einen graduierten

Kolben 100 cm³ ab. Der Trichter ist mit einer Glasscheibe zu bedecken. Die Chloroformlösung ist in zwei Fraktionen aus einem 125 cm³-Kolben bis zu einem sirupösen, grünlich gefärbten Rückstand abzdampfen. Man fügt dem Rückstand 20 cm³ Petroläther und 25 cm³ einer Mischung von 10 cm³ Salzsäure 1,17 + 40 cm³ Wasser zu, verschließt mit einem Kautschukstopfen und schüttelt durch. Man gießt in einen Scheidetrichter, läßt trennen und zieht die saure Lösung in einen zweiten Scheidetrichter ab. Die im ersten Scheidetrichter zurückgebliebene, grüne Lösung wird sukzessive mit 15, dann mit 10 cm³ der sauren Mischung geschüttelt, wobei dieselben Mengen zuerst zum Ausspülen des Destillationskolbens benützt werden. Die vereinigten, sauren Lösungen werden abermals mit 5 cm³ Petroläther durchgeschüttelt und nach Trennung der Schichten in einen neuen Scheidetrichter übergeführt, mit Ammoniak übersättigt und dreimal mit je 20 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformlösungen werden mit 2 cm³ Wasser gewaschen und in einen tarierten, konischen Kolben von 90 cm³ in zwei Malen abdestilliert und der Rückstand bei 100° getrocknet und gewogen.

Bei Samen Colae werden die Verhältnisse modifiziert, indem die gleiche Menge Ausgangsmaterial wie bei Tee mit 10 g MgO + 15 cm³ H₂O behandelt wird. Der Chloroformrückstand wird bei 100° getrocknet und dann mit 12 cm³ einer Mischung von 5 cm³ HCl 1,17 und 10 cm³ H₂O aufgenommen, wovon 10 cm³ in einem entsprechend geeichten Scheidetrichter gesammelt werden. Man macht mit Ammoniak alkalisch, schüttelt dreimal mit je 20 cm³ Chloroform aus und behandelt die Chloroformauszüge in einem zweiten Scheidetrichter mit 2 cm³ Wasser. Es wird bei 100° getrocknet und dann gewogen.

Extractum Colae fluidum wird ähnlich behandelt. 15 g des Extraktes werden auf 7 g eingedampft und in einem Mörser nach viermaligem Ausspülen der Schale mit je 2 cm³ Wasser mit 10 g Magnesia usta zu einer homogenen Masse verrieben und eine Stunde sich selbst überlassen. Die Masse wird 45 Minuten am Rückflußkühler auf dem Wasserbad mit 150 g Chloroform behandelt; nach Erkalten wird das Chloroform ergänzt, durchgeschüttelt und in 100 g des Filtrates das Coffein nach Abdestillieren und Trocknen bei 100° gewogen.

Für Kaffee gelten die gleichen Verhältnisse der Ausgangsmaterialien wie bei Tee. Der Chloroformrückstand wird mit 24 cm³ H₂O auf dem Wasserbad auf 60—65° erhitzt, gut durchgeschüttelt und 20 cm³ des Filtrates dreimal mit je 20 cm³ Chloroform ausgeschüttelt.

Bei Guarana nimmt man 9 g Trockensubstanz mit 6 g Magnesia und 10 cm³ H₂O und 90 cm³ Chloroform in Arbeit, wovon 60 cm³ Filtrat wie bei Samen Colae weiter behandelt werden.

Bei Verwendung von nicht sodafreier Magnesia sind auch bei dieser Methode geringe Verluste zu befürchten. Zudem ist diese recht umständlich, indem z. B. bei der Teeanalyse drei Scheidetrichter gebraucht werden.

Wolf¹⁰⁰ veröffentlicht 1906 ein Verfahren, das sich an dasjenige von Trillich und Göckel⁸⁶ 1897 anschließt, indem

er die Droge mit Essigäther völlig extrahiert, den Rückstand mit Magnesiumoxyd und Wasser kochend aufnimmt, filtriert, eindampft, mit Chloroform auszieht und eine N-Bestimmung ausführt. Weitere Bedeutung hat dieses Verfahren nicht erlangt.

In seiner Arbeit über das chlorogensaure Kali bedient sich Gorter³⁴ einer eigenen Methode für rohen Kaffee.

11 g sehr fein gepulverter Kaffee werden mit 3 cm³ H₂O durchfeuchtet. Nach ½ Stunde wird die Masse drei Stunden lang im Soxhletschen Apparat extrahiert. Nach Abdestillieren des Chloroforms wird der Rückstand mit heißem Wasser ausgezogen, das Fett über einem Wattepfropfen abfiltriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wird nach Erkalten mit Wasser auf 55 cm³ aufgefüllt; 50 cm³ dieser Lösung schüttelt man viermal mit Chloroform aus und destilliert das Chloroform ab.

Murray⁶² weist in einer Veröffentlichung über die vergleichende Bestimmung kleiner Coffeinmengen nach der Görter-schen und Lendrich-Nottbohm'schen Methode auf die höheren Resultate der ersteren hin.

1909 veröffentlichen Lendrich und Nottbohm⁵⁸ ein Coffeinbestimmungsverfahren für Kaffee, das mit einigen Änderungen in die „Entwürfe zu den Festsetzungen über Lebensmittel, Heft 5: Kaffee“, herausgegeben vom Kaiserlichen Gesundheitsamt, aufgenommen worden ist:

20 g des feingemahlten Kaffees werden in einem Becherglas mit 10 cm³ 10%iger Ammoniaklösung versetzt, sofort durchgemischt und unter zeitweiligem Umrühren bei rohem Kaffee zwei Stunden, bei geröstetem eine Stunde stehen gelassen. Hierauf wird das Pulver mit 20—30 g grobkörnigem Quarz-pulver gemischt, verlustlos in einen Extraktionsapparat gebracht und etwa drei Stunden mit Tetrachlorkohlenstoff unter Erhitzen des Extraktionskolbens auf einem Drahtnetz ausgezogen. Dem Auszug wird 1 g festes Paraffin zugesetzt, hierauf der Tetrachlorkohlenstoff abdestilliert und der Rückstand zunächst mit 50, dann dreimal mit je 25 cm³ möglichst heißem Wasser ausgezogen. Die abgekühlten, wäßrigen Auszüge werden durch ein angefeuchtetes Filter filtriert, wobei zu vermeiden ist, daß Teile der Paraffinschicht auf das Filter gelangen. Das Filter wird mit heißem Wasser ausgewaschen. (Man behilft sich am besten so, daß man über das Filter einen kleinen Trichter mit einem Wattebausch anbringt. Man hält durch diese doppelte Filtration das Filter von Paraffin und Fett frei und gelangt rascher zum Ziel.) Das auf Zimmertemperatur abgekühlte Filtrat wird bei rohem Kaffee mit 10 cm³, bei geröstetem mit 30 cm³ einer 1%igen Kaliumpermanganatlösung versetzt und 15 Minuten stehen gelassen. Hierauf wird das Mangan unter Zutropfen einer 3%igen Wasserstoffsperoxydlösung, die außerdem 1% Essigsäure enthält, zur Abscheidung gebracht. Das Gemisch wird ¼ Stunde auf dem Wasserbad

erhitzt, der Niederschlag abfiltriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wird in einer Glasschale auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft, der Rückstand $\frac{1}{4}$ Stunde im Dampftrockenschrank getrocknet und mit Chloroform ausgezogen. Nach Filtrieren und Auswaschen wird das Lösungsmittel abdestilliert oder abgedunstet und das so erhaltene Coffein nach $\frac{1}{2}$ stündigem Trocknen im Dampftrockenschrank gewogen. Falls der nach vorstehendem Verfahren ermittelte Coffeingehalt bei coffeinfreiem Kaffee mehr als 0,08% und bei coffeinarmem Kaffee mehr als 0,2% beträgt, ist die Reinheit des erhaltenen Coffeins durch Ermittlung seines Stickstoffgehaltes nach dem Kjeldahlverfahren nachzuprüfen. Wird hierbei weniger Stickstoff gefunden, als der erhaltenen Menge entspricht, so ist die durch Multiplikation der ermittelten Menge Stickstoff mit 3,464 berechnete Menge Coffein als maßgebend anzusehen.

Die Autoren legen mittelst Kurven überzeugend dar, daß zur vollständigen Extraktion des Coffeins die zu erschöpfende Droge nicht in trockenem Zustande Verwendung finden darf, und daß ein Durchfeuchten mit Wasser zur Spaltung der Coffeinverbindung genügt (Lendrich-Murfield)⁶⁷. Ammoniakzusatz hat vor der Verwendung von Wasser nur den Vorteil, daß er schneller wirkt, wie schon Gadamer 1899 festgestellt hat. Zur Erschöpfung wird Tetrachlorkohlenstoff verwendet, weil dieses Extraktionsmittel, wie schon erwähnt, dem gerösteten Kaffee am wenigsten Extraktivstoffe entzieht. Ein wesentlich neuer Weg wird bei der Reinigung des Auszugs eingeschlagen, indem die Coffeinwasserlösung mittelst 1% iger Kaliumpermanganatlösung von den Farb- und Extraktivstoffen befreit wird. Beinahe vollständige Beseitigung der Verunreinigungen wird durch das Eindunsten der vom überschüssigen Kaliumpermanganat befreiten Wasserlösung erreicht, wodurch manche Extraktivstoffe unlöslich werden. Das auf diese Weise erhaltene Coffein ist sehr rein. Der Schmelzpunkt soll von dem des Handelscoffeins nicht differieren. Andere Verfahren haben die Verfasser nicht zum Vergleich herangezogen, da ihre Resultate eindeutig ausgefallen, die einzelnen Phasen der Analyse nachkontrolliert und durch entsprechende Versuche gestützt worden sind. Weil⁹⁶ sowie Philipp⁶⁷ bezeichnen das Verfahren als genau. Hartwich³⁹ hat in der Folge auf die ungenügende Zeitdauer von drei Stunden für die Tetrachlorkohlenstoffextraktion hingewiesen, ebenso Fendler und Stüber²³, die dieselbe auf sechs Stunden erhöhen.

Virchow⁹³ berichtet 1910 über Coffein-Bestimmungen in Kaffee, die insofern etwas neues bieten, als der Autor die mit Magnesiumoxyd und Wasser versetzte Droge viermal mit einem bestimmten Quantum Chloroform ausschüttelt und dann den Auszug weiter verarbeitet. Das Endresultat wird durch eine Stickstoffbestimmung gewonnen.

10 g Kaffee werden mit 2,5 g MgO und 10 g Wasser in einem Schüttelzylinder mit 100 cm³ Chloroform eine Minute tüchtig geschüttelt und nach Ablassen des Lösungsmittels noch zweimal mit der gleichen Menge ausgezogen; nach Zusatz von 1 g Paraffin. solid. destilliert man das Chloroform ab und bläst die letzten Anteile des Lösungsmittels vollständig ab. Der Inhalt des Kolbens, der auf dem Wasserbad verbleibt, wird bei einer Temperatur von 70—80° mit 25 cm³ heißem Wasser behandelt, in ein 150 cm³-Becherglas abgegossen und der gleiche Vorgang dreimal wiederholt.

Das Becherglas wird ins Wasserbad eingehängt, das Paraffin durch Rühren mittelst Glasstabes zu klarem Schmelzen gebracht, die Wasserlösung abgekühlt und filtriert. Filter und Glas werden mit kaltem Wasser nachgewaschen. Der Auszug wird in einer tarierten Schale eingedampft und der Rückstand gewogen. Zur Reinigung wird der Rückstand in möglichst wenig Wasser unter Erwärmen aufgenommen, unter Umrühren mit einem Glasstab eingedunstet und allmählich, wenn die Lösung konzentrierter wird, mit kleinen Mengen fein gepulverter Magnesia usta versetzt, vollständig zur Trockene gebracht, die Masse zu möglichst feinem Pulver zerdrückt, dieses in ein kleines Becherglas unter Nachwischen mit wenig fettfreiem Papier gebracht und nun durch dreimaliges Auslaugen und Dekantieren mit Chloroform das Coffein isoliert. Man erhält fast reines Coffein, dessen genauen Wert man mittelst einer Stickstoffbestimmung kontrolliert. Dieselbe wird mit 0,4 g Quecksilberoxyd und 0,4 g entwässertem Kupfersulfat und 10 cm³ konz. Schwefelsäure ausgeführt, das Ammoniak unter Zugabe von 60 cm³ 50 %iger Natronlauge und 5 cm³ einer 2 g Natriumthiosulfat enthaltenden Lösung im Dampfstrom ohne Abkühlung in vorgelegte $\frac{n}{10}$ -H₂SO₄ übergetrieben und mittelst alizarinsulfosaurem Natrium titriert.

Die angewendete Aufschließungsmethodik (MgO während einer Minute) genügt zur Spaltung sicher nicht. Es wird eben z. T. die Coffeinverbindung als solche in Chloroform übergehen.

1914 veröffentlichen Fendler und Stüber²³ ein abgeändertes Lendrich-Nottbohm-Verfahren, resp. kombinieren das Kellersche mit dem vorerwähnten, um dessen Dauer abzukürzen. Sie nehmen die Permanganat-Reinigung in dem mit Wasser aufgenommenen Rückstände vor, der hergestellt wird nach Keller, d. h. durch Schütteln der mit Chloroform und Ammoniak versetzten Droge und Abgießen eines aliquoten Teiles, und gewinnen das Coffein

durch Ausschütteln der Wasserlösung mittelst Chloroform. Sie erhalten im wesentlichen mit dem Lendrich-Nottbohm-Verfahren übereinstimmende Resultate und vergleichen zudem die Methoden von Katz und Keller.

Das isolierte Alkaloid ist dunkler gefärbt und stellt sich in der Farbnuance zwischen das von Lendrich-Nottbohm und Katz isolierte.

10 g gepulverten Kaffees werden in einer Glasstöpselflasche mit 10 g 10%igen Ammoniak und 200 g Chloroform $\frac{1}{2}$ Stunde lang ohne Unterbrechung kräftig geschüttelt. Man gewinnt 150 g Filtrat, dampft ein, bläst noch vorhandenes Chloroform ab und übergießt mit 80 cm³ heißem Wasser. Unter öfterem Umschwenken wird 10 Minuten auf dem siedendem Wasserbad digeriert. Man kühlt ab, gibt bei geröstetem Kaffee 20, bei Rohkaffee 10 cm³ 1%ige Kaliumpermanganatlösung hinzu und läßt eine Viertelstunde bei Zimmer-temperatur stehen. Ist die Flüssigkeit nicht mehr rötlich oder rot gefärbt, so stellt man den Kolben auf ein siedendes Wasserbad, und nach einigen Minuten werden Portionen von je 0,5 cm³ der sauren 3%igen Wasserstoff-superoxydlösung zugefügt, bis die Lösung bei weiterem Zusatz nicht mehr heller wird. Im ganzen läßt man $\frac{1}{4}$ Stunde auf dem Wasserbad stehen. Man kühlt ab, filtriert durch ein benetztes, glattes Filter von 9 cm Durchmesser, dann werden Kolben und Filter mit kaltem Wasser nachgewaschen. Das klare, 200 cm³ betragende Filtrat wird zunächst mit 50, dann dreimal mit je 25 cm³ Chloroform ausgeschüttelt, die vereinigten Ausschüttelungen werden in einem gewogenen, weithalsigen Kölbchen von etwa 250 cm³ Fassungsvermögen abdestilliert. Man bläst letzte Anteile Chloroform ab und trocknet den Rückstand bei 100° bis zur Gewichtskonstanz, was in einer halben Stunde erreicht zu sein pflegt.

Analysenresultate von Fendler-Stüber.

Lendrich-Nottbohm		Fendler-Stüber		Katz		Keller-Siedler	
Gewogen %	N-Be- stimmung	Gewogen %	N-Be- stimmung	Gewogen %	N-Be- stimmung	Gewogen %	N-Be- stimmung
Rohkaffee:							
1,26	1,24	1,26	1,23	1,30	1,21	1,27	1,09
1,26	1,22	1,26	1,20	1,31	1,21	1,25	1,03
1,25	—	1,23	—	1,29	—	1,17	—
Schmelzpunkt des isolierten Coffeins: 236,8—237,4°		235,3—235,9°		235—235,2°		233,2—233,5°	
Gerösteter Kaffee:							
1,42	—	1,39	—	1,43	—	1,45	—
1,41	—	1,39	1,38	1,45	1,38	1,48	1,24
1,41	—	1,42	1,38	1,43	1,36	1,50	1,21
1,39	—	1,42	—	1,44	—	1,45	—
1,40	1,38	—	—	1,44	—	—	—
1,40	1,38	—	—	—	—	—	—

J. J. B. Deuß¹⁷ berichtet über vergleichende Kontrollbestimmungen auf refraktometrischem Wege (Hanuš und Chocenský³⁸) eines nach dem Verfahren von van Romburgh und Nanninga⁷⁵ erhaltenen Coffeins:

10 g Tee werden mit so viel Wasser versetzt, daß der Wassergehalt 20—25% beträgt, und mit Chloroform im Soxhletapparat extrahiert. Nach Abdestillieren wird der Rückstand in siedendem Wasser aufgenommen, mit einigen Tropfen Bleiacetat und ein wenig Knochenkohle versetzt und auf 125 cm³ aufgefüllt. Vom Filtrat werden 100 cm³ mit 60—70 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. Das Coffein wird nach Abdestillieren und Trocknen im Wassertrockenschrank gewogen. Man kann das Coffein wieder in Wasser lösen und aus der Refraktion den Gehalt der Lösung bestimmen.

Vauthier⁹² arbeitet bei Anlaß der Nachprüfung des Philippschen Sublimationsverfahrens ähnlich wie 1865 Claus (vide ältere Literatur).

Es geht folgendermaßen vor zur Bestimmung kleiner Coffeinemengen in coffeinarmem Kaffee und in Mischungen von Kaffee mit Kaffee-Ersatzprodukten.

5 g fein gemahlener Kaffee werden mit 5 cm³ Ammoniak versetzt und im Soxhlet mit Äther in drei Stunden erschöpft. Der nach Abdestillieren des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wird mit heißem Wasser aufgenommen. Man filtriert und wäscht nach, so daß ein Filtrat von 150 cm³ erhalten wird. Der durch Eindampfen auf dem Wasserbad erhaltene Rückstand wird mit wenig heißem Wasser aufgenommen; man filtriert und wäscht nach (Gesamtfiltrat 30—50 cm³) und wiederholt diesen Vorgang. Nach der zweiten Filtration werden die noch bleibenden Extraktivsubstanzen vom Charakter der Huminsäure durch ein erneutes Eindampfen bis zur absoluten Trockene unter Zusatz von 0,1—0,2 g Soda für trockenes Chloroform unlöslich gemacht. Der Rückstand wird fünf- bis sechsmal mit je 3—5 cm³ Chloroform aufgenommen, die Lösung filtriert und nach Eindunsten bei 100° das Coffein getrocknet und gewogen.

Vergleichende Bestimmungen ergeben gute Übereinstimmung der Wägesresultate mit dem aus der Stickstoffbestimmung errechneten.

In neuerer Zeit haben zwei amerikanische Autoren, Power und Chesnut⁶⁹, ein weiteres Verfahren veröffentlicht, das in den einzelnen Phasen mit Ausnahme der Einschaltung einer Hydrolyse mit 10%iger Schwefelsäure zur Spaltung vorhandenen Saponins und Entziehen der immer noch mitgehenden Farbstoffe durch Behandlung der Chloroformlösung mit 1%iger Kalilauge (vide Paul

und Cownley) nichts neues bietet. Die Originalarbeit ermittelt den Coffeingehalt von *Ilex vomitoria*-Blättern, und die Methode wird auf die übrigen Drogen übertragen.

Zur Bestimmung des Coffeins in Vegetabilien werden 10 g der fein gepulverten Droge mit wenig Alkohol angefeuchtet und im Soxhlet acht Stunden mit Alkohol extrahiert. Den alkoholischen Auszug gibt man zu einer Suspension von 10 g sodafreier *Magnesia usta ponderosa* in 100 g Wasser und erwärmt das Gemisch auf dem Wasserbad unter ständigem Umrühren, bis man eine nahezu trockene, pulverige Masse erhält. Diese bringt man mit genügend heißem Wasser quantitativ auf ein Filter. Man wäscht heiß nach, so daß ca. 250 cm³ Filtrat erhalten werden. Zu diesem Filtrat gibt man 10 cm³ 10%ige Schwefelsäure — zuweilen, um bei der Chloroformextraktion Emulsionen zu vermeiden, sind 20 cm³ notwendig. Zur Hydrolyse vorhandenen Saponins wird $\frac{1}{2}$ Stunde unter Rückfluß erwärmt und das abgekühlte Gemisch in einen Scheidetrichter filtriert. Filter und Kolben werden mit $\frac{1}{2}$ %iger Schwefelsäure nachgewaschen. Die Flüssigkeit schüttelt man sechsmal mit je 25 cm³ Chloroform aus. Falls es sich als notwendig erweist, werden größere Mengen Chloroform verwendet. Die vereinigten Chloroformauszüge werden in einem trockenen Scheidetrichter mit 5 cm³ 1%iger Kalilauge zur Entfernung der färbenden Bestandteile durchgeschüttelt. Das Lösungsmittel wird abgelassen und die Kalilauge mit wenig Chloroform zweimal nachgewaschen. Die filtrierte Chloroformlösung wird vom Lösungsmittel befreit und das Coffein nach dem Trocknen bei 100° gewogen.

Theoretisch ist zu dieser Methode zu bemerken, daß man bei Tee, Kaffee, Kola und Guarana auch einfacher zum Ziele kommt. Die Farbstoffe müssen am Ende der Analyse noch entfernt werden. Bei Kola und Guarana wäre weiter zu untersuchen, ob die Hydrolyse mit Schwefelsäure nicht besser vor der Magnesiabehandlung vorzunehmen wäre, indem die Farbstoffe nach einer solchen Aufspaltung durch Eindampfen mit MgO fast vollständig entfernt werden können (vide Mikroverfahren). Speziell zu erwähnen ist auch hier die Notwendigkeit der Verwendung von sodafreier *Magnesia usta ponderosa*, da sonst teilweise Zerstörung des Coffeins eintritt.

d) Methoden, bei denen zur Extraktion oder Reinigung die Sublimation verwendet wird.

Die Methoden dieser Gruppe bringen insofern prinzipiell neues, als in irgend einer Phase des Analysenganges von der leichten Sublimierbarkeit des Coffeins Gebrauch gemacht wird

Bekannt ist dieselbe schon lange gewesen. So haben bereits 1850 Stenhouse und Heyn Coffein aus Drogen durch Sublimation erhalten. Waddington, Behrens, Th. und C.J. Weewers, Nestler, Kley, Vadam, Spencer, Frank⁸⁷ (pag. 312) haben sich weiter mit dem qualitativen Nachweis der Xanthinbasen beschäftigt. Die Möglichkeit einer qualitativen Trennung von Theobromin und Coffein mittelst Sublimation ist von Tunmann⁸⁸ und Eder²⁰ bewiesen worden.

Als erste Anwendung der Sublimierarbeit des Coffeins in quantitativer Beziehung kann eine Arbeit von Netolitzky⁶⁴ betrachtet werden, der aus dem Rauch von 25 g Tee-Zigaretten 0,27 g fast farbloses, kristallisiertes Coffein erhalten hat.

Burmann⁹ hat 1910 eine Sublimationsmethode zur Coffeinbestimmung in Kaffee veröffentlicht, doch soll zuerst eine Arbeit aus dem Jahre 1921 erwähnt werden, welche die Sublimation des Coffeins aus der Droge als erste Phase des Analysenganges benutzt.

Trifon Ugarte⁸⁹ hat folgende Methode veröffentlicht:

0,5 g der fein gepulverten Droge werden genau abgewogen und unter Nachwischen mit einem Pinsel sorgfältig in einen 500 cm³ Kjeldahlkolben gebracht, so daß das gesamte Material sich am Grunde ansammelt. Mittelst einer 2—3 cm hohen Gasflamme, eventl. unter leichtem Hin- und Herbewegen verkohlt man die Substanz vollständig. Beim Entwickeln von weißen, dichten Dämpfen läßt man dieselben durch Wegnehmen der Flamme zurückfallen. Nach Erkalten des Kolbens gibt man 5 cm³ destilliertes Wasser hinzu, läßt aufkochen, benetzt die ganze Wand damit, filtriert und wiederholt dreimal. Das ca. 20 cm³ betragende Filtrat wird in einer Kristallisierschale von 7 cm Durchmesser auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft. Man löst den Rückstand in 2 cm³ Wasser auf, fügt 1—2 Tropfen n-Ammoniak und 5 cm³ Chloroform hinzu und rührt mit einem Glasstabe um. Das Gemenge wird auf ein mit Chloroform imprägniertes Filter gebracht und die Chloroformlösung in einem kleinen Becherglas aufgefangen. Kristallisierschale und Filter werden noch zweimal mit je 5 cm³ Chloroform nachgewaschen, bevor das organische Lösungsmittel jeweils abgelaufen ist. Man bringt zur Trockene, nimmt den Rückstand in 2 cm³ Wasser auf, läßt 2 Minuten auf dem Wasserbad einwirken und filtriert in ein tariertes Uhrglas. Man wiederholt zweimal, dampft auf dem Wasserbad ein, trocknet den Rückstand im Trockenschrank bei 100—105° während fünf Minuten und wägt. Der Kolben kann für mehrere Bestimmungen dienen, wenn eine kleine Flamme verwendet und die Innenwand des Kjeldahlkolbens mit verdünnter warmer Sodalösung jeweils von den Verunreinigungen befreit wird. Eine Analyse kann in ungefähr zwei Stunden zu Ende geführt werden.

Analysenresultate von F. Ugarte.

	Makrobestimmung nach Paul und Cownley %	Sublimationsmethode Ugarte %	Differenzen %
Mate	0,980	1,087	+ 0,11
Kaffee (schlechte Qualität)	0,975	1,200	+ 0,22
Kola (Muster als schlechte Qualität erkannt) . . .	0,605	0,804	+ 0,20
Tee	2,360	2,000	- 0,36
Guarana	3,740	3,400	- 0,34

Wie die Analysenzahlen zeigen, ist die beschriebene Methode nicht so vertrauenerweckend, daß man sich mit ihr zufrieden geben könnte. Die Differenzen sind doch recht erheblich, fallen sowohl zu hoch wie zu niedrig aus, ganz abgesehen von der Richtigkeit der Kontrollanalysen von Paul und Cownley, und es sind keine Doppelanalysen vorhanden. Zudem wird bei Kaffee und Kola das verwendete Material als schlecht bezeichnet.

Das Burmannsche Sublimationsverfahren geht folgendermaßen vor:

5 g Kaffee werden gemahlen und im Trockenschrank oder Vakuum getrocknet. Das Pulver wird in einem 100 cm³ Erlenmeyerkolben 10 Minuten mit 50 cm³ Petroläther (Sdp. < 60°) behandelt, auf ein zylindrisches Porzellanfilter von 6 cm Durchmesser gebracht und nochmals mit 25 cm³ Petroläther behandelt. Man wäscht mit 25 cm³ Petroläther nach. Das Fett wird nach Abdestillieren des Lösungsmittels und Trocknen des Rückstandes im Trockenschrank gewogen. Das an der Luft getrocknete, entfettete Pulver wird quantitativ in eine 200 cm³-Flasche gebracht, mit 150 cm³ Chloroform übergossen und einige Minuten geschüttelt. Man fügt 5 g 10%igen Ammoniak hinzu, schüttelt während 1/2 Stunde öfters kräftig durch und filtriert 120 cm³ ab unter Bedecken des Trichters mit durch Chloroform imprägnierte Papierdellen. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Rohcoffein gewogen. Zu Reinigung wird letzteres quantitativ in ein entsprechend geformtes Reagensglas von 15—18 cm Länge und 15—18 mm Weite mit Chloroform übergeführt, alsdann getrocknet und im Paraffinbad bei 210—240° sublimiert. Die Sublimationsdauer soll drei Stunden betragen. Um das Coffein zur Wägung zu bringen, muß das Apparätchen zerstört werden. Das sublimierte Coffein wird mit Chloroform herausgespült, eventl. einer zweiten Sublimation unterworfen und in einem tarierten Schälchen oder Kölbchen nach dem Trocknen gewogen.

Das Verfahren ist, trotzdem es noch 1919 in Königs Handbuch der Lebensmittelchemie aufgeführt worden ist mit der

Bemerkung „rein dürfte das erhaltene Coffein schon sein, ob aber alles?“, 1915 schon von Fendler und Stüber einer mit Recht vernichtenden Kritik unterworfen worden. Sie wiesen nach, daß bei 70 mg unter den beschriebenen Verhältnissen mit einer Sublimationsdauer von sechs Stunden gerechnet werden muß, daß also die von Burmann angegebene Zeit viel zu niedrig bemessen ist. Durch die Behandlung mit Petroläther geht zudem Coffein verloren, und die gewogene Base ist zudem wesentlich unreiner als das nach Lendrich-Nottbohm oder Fendler-Stüber isolierte Coffein.

In die dritte Auflage des schweizerischen Lebensmittelbuches 1917 hat zur Bestimmung des Coffeins in Kaffee und Tee ein von Philipp⁶⁷ ausgearbeitetes Verfahren Eingang gefunden, daß die Resultate durch Wägen des auf ein Uhrglas sublimierten Coffeins nach vorausgegangener Reinigung gewinnt. Die ursprüngliche Arbeit bezieht sich auf die Teeanalyse.

In einen Scheidetrichter von ca. $\frac{1}{2}$ Liter Inhalt gibt man 10 cm³ 10%iges Ammoniak, setzt dann 5 g fein gepulverten Kaffee resp. 3 g Tee hinzu, schwenkt vorsichtig um und läßt einige Minuten stehen. Sodann wird viermal mit je 50 cm³ Chloroform während je drei Minuten geschüttelt und das Chloroform jeweils durch ein kleines Faltenfilter in einen Erlenmeyer abgelassen. Die vereinigten Filtrate werden auf den heißen Wasserbad abdestilliert. Den Rückstand versetzt man mit etwa 120 cm³ Wasser und 20 cm³ $\frac{9}{10}$ -Schwefelsäure und erhitzt auf freier Flamme bis zum Sieden. Nach dem Abkühlen wird, um das Coffein nach Möglichkeit von Verunreinigungen zu befreien, in dem inzwischen gereinigten Scheidetrichter mit 50 cm³ Äther ausgeschüttelt, die saure Lösung mit Ammoniak deutlich alkalisch gemacht und wie zu Anfang mit Chloroform ausgeschüttelt. Die filtrierten und vereinigten Chloroformauszüge werden auf ein kleines Volumen gebracht, unter Nachspülen mit wenig Chloroform in eine flache Glasschale ohne Ausguß übergeführt und in dem hierzu konstruierten Apparate der Sublimation unterworfen. Die Sublimation des gereinigten Coffeins wird in einer Glasschale vorgenommen, der mittelst Kautschukring ein Uhrglas aufsitzt, wobei eine Wasserkühlung die Kondensation am Uhrglas ermöglicht. Erhitzt wird mittelst eines Pilzbrenners.

In einer späteren Arbeit aus dem schweizerischen Gesundheitsamt ersetzt Vauthier⁹² infolge des Krieges das teure Chloroform durch Äther, wie Klaus 1865, und sublimiert nach Philipp, weist aber dann in der Folge bei Coffeinbestimmungen in coffeinarmem und coffeinfreiem Kaffee auf den Sublimationsfehler des

Philippschen Verfahrens hin, indem auch bei diesem infolge ungenügender Reinigung des Auszuges ein unreines, zu hohe Resultate bedingendes Endprodukt erhalten wird.

1b. Indirekte gravimetrische Coffeinbestimmung.

Azadian² benutzt die Fällbarkeit des Coffeins durch Kieselwolframsäure, die, wie schon erwähnt, zu einer nephelometrischen Ausmittelung in Betracht kommt. In 5%iger salzsaurer Lösung wird Coffein in Form eines Niederschlages entsprechend der Zusammensetzung $12 \text{WO}_3 \cdot \text{SiO}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \cdot 3 \text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ gefällt. Beim Veraschen verbleibt $12 \text{WO}_3 \cdot \text{SiO}_2$, woraus sich ein Umrechnungsfaktor von 0,2648 für Coffein ergibt. Der Verfasser benutzt das Verfahren zur Alkaloidbestimmung in Drogen (Tee und Kola) und deren Präparaten.

Nach einer kritischen Zusammenstellung über die quantitative Bestimmung von Alkaloiden durch Wägen schwer löslicher Salze können nach Herzig⁴² nur durch Einhalten ganz bestimmter Versuchsbedingungen annehmbare Resultate erhalten werden, da die Zusammensetzung der Niederschläge keine konstante ist. Mikrochemisch würde man bei gleichem Vorgehen wohl mit vermehrten Schwierigkeiten zu kämpfen haben.

2. Titrimetrische Bestimmungsmethoden.

a) Kjeldahl-Bestimmung.

Die Kjeldahlsche Stickstoffbestimmung, die in verschiedenen Modifikationen zur Ausführung kommt, wird sehr häufig zur Kontrolle der Reinheit des isolierten Coffeins herangezogen oder führt, wie bei dem Forster-Riechelmanschen Verfahren, ohne Wägung zum Endresultat. $\text{N} \cdot 3,464$ ergibt den Gehalt an wasserfreiem Coffein.

b) Jodometrische Bestimmungen.

Gomberg⁸³ fällt einen gereinigten Teeauszug mit Wagnerschem Reagens (Jodjodkali) in saurer Lösung und titriert den Überschuß zurück. Analog arbeitet ein Verfahren von Neßler⁶⁸ mit Brombromkalilösung.

Nach der bei Herzig zitierten Literatur⁴² ist auch bei diesen Verfahren die Zusammensetzung der Niederschläge variabel, so daß diese Methoden keine praktische Bedeutung haben.

Obwohl nicht eigentlich hierher gehörend, mag doch der Versuch Thoms-Jonescu⁸⁵ erwähnt werden, Coffein aus wäßriger Lösung durch Kaliumwismuthjodid zu fällen, den Niederschlag durch konz. Sodanatronlauge zu zerlegen und das Coffein durch Aufnehmen in Chloroform als solches zur Wägung zu bringen. Die Anwendung starker Alkalien führt zu Verlusten.

c) Elektrotitrimetrische Bestimmung.

Coffein ist als eine zu schwache Base nach Versuchen von Treadwell-Janett⁴⁵ durch Neutralisation mit Säure konduktometrisch nicht titrierbar.

3. Refraktometrische Bestimmung.

Hanuš und Chocenský⁸⁸ benutzen das Zeißsche Eintauchrefraktometer zur Bestimmung des Brechungsexponenten einer wäßrigen Coffeinelösung, um Verluste durch Verflüchtigen des Alkaloides beim Trocknen zu vermeiden, und bestimmen aus der Differenz der Refraktionswerte Wasser-Coffeinelösung bei 17,5° den Prozentgehalt.

Utz⁹¹ hat das Verfahren nachgeprüft und richtig befunden.

In Anwendung auf die Coffeinbestimmung in Tee werden leicht zu hohe Resultate ermittelt, da das Alkaloid niemals ganz rein erhalten wird. Deuß¹⁷ berichtet über vergleichende Bestimmungen.

4. Spektrographische Mikrobestimmung.

Victor Henri⁴⁰ hat im Speichel von mit Coffein vorbehandelten Rennpferden die Base durch Ausmessung des Absorptionsspektrums quantitativ ermitteln können. Es gelang ihm, 0,1 bis 0,2 mg mit einem Fehler von ca. 10% zu ermitteln. Auch andere Alkaloide, Apomorphin, Codein usw. sind auf diese Weise quantitativ ermittelt worden¹.

5. Biologische Mikrobestimmungsmethode.

Friedberg^{28; 29} hat zur quantitativen Messung der zeitlichen Coffeinausscheidung im Harn das Eintreten der bekannten Coffein-Muskelstarre eines Zupfpräparates von Muskelfasern des Grasfrosches benutzt und gelangt durch Änderung der Konzentration zur Schätzung resp. Bestimmung von Mengen „Aktivpurin“ bis zu 0,00007 g. Der Fehler soll kleiner sein als 10%.

II. Methoden der Coffein- und Theobrominbestimmung in Kakao.

Im Alkaloidgemisch des Kakaosamens überwiegt Theobromin (1,2—2,4%) das Coffein (0,05—0,36%). Die vorgeschlagenen Bestimmungsmethoden sind infolge der Schwerlöslichkeit des Theobromins zum Teil wesentlich verschieden von den besprochenen Coffeinbestimmungsmethoden, weisen aber doch in vielen Fällen Ähnlichkeiten und Berührungspunkte auf. Die Mehrzahl der Verfahren ermitteln die Summe beider Basen gravimetrisch, während andere nur das Theobromin bestimmen.

*) Nach einer unveröffentlichten Arbeit, für deren Bekanntgabe ich Herrn Prof. V. Henri zu verbindlichstem Dank verpflichtet bin.

1. Gravimetrische Bestimmung.

Dekker¹⁶ veröffentlicht 1902 eine zusammenfassende Kritik über die bis zu diesem Zeitpunkt bekannt gewordenen quantitativen Bestimmungsmethoden der Xanthinbasen in Kakao (Verfahren von Kunze, Weigmann, Wolfram, Legler, Mulder, Trojanowsky, Bell, Zipperer, Diesing, Mansfeld, Süß, Beckurts, Schmidt, Hilger und Eminger, Maupy) und gibt eine eigene Methode. Diese hält einer Kritik von Welmann⁹⁸, Beckurts und Fromme⁵, Katz⁴⁹, welch letzterer eine eigene Methode veröffentlicht, nicht stand, und Prochnow⁷¹ kombiniert das von Fromme-Beckurts zur Aufnahme in die Entwürfe zu „Festsetzungen über Lebensmittel“, herausgegeben vom Kaiserlichen Gesundheitsamt, vorgeschlagene Verfahren mit dem Katzschen in der folgenden Weise:

6 g gepulverter Kakao oder 12 g gepulverte Schokolade werden mit 197 g Wasser und 3 g verdünnter Schwefelsäure in einem tarierten Literkolben $\frac{1}{2}$ Stunde am Rückflußkühler gekocht. Hierauf fügt man mittelst der Mensur 400 g Wasser und 8 g damit angeriebene Magnesia usta hinzu und kocht eine Stunde. Man setzt nun sofort 30—50 g kaltes Wasser, entsprechend der etwa verdampften Wassermenge, hinzu, schüttelt gut durch und stellt auf der Wage das Gewicht des Kolbeninhaltes abzüglich der Kakao- resp. Schokoladenmenge fest. Man läßt absitzen, filtriert fünf Sechstel des zuvor festgestellten Gewichtes, entsprechend 5 g Kakao bzw. 10 g Schokolade, durch ein Faltenfilter und dampft diese Flüssigkeitsmenge in einer Porzellanschale bis fast zur Trockene ein. Der Rückstand wird in so viel Wasser aufgenommen, daß man etwa 25 cm³ Flüssigkeit erhält. Man fügt 25 Tropfen verflüssigtes, farbloses Phenol hinzu und schichtet den Extrakt über das im Katzschen Perforator befindliche Chloroform. In dem am Perforator befestigten Extraktionskölbchen muß sich eine größere Chloroformmenge befinden. Man perforiert sechs Stunden auf lebhaft siedendem Wasserbad. Wenn man sicher ist, daß die Perforation ohne Unterbrechung vor sich gegangen ist, ist eine nochmalige Perforation unnötig. Das Chloroform wird abdestilliert; die 25 Tropfen Phenol werden aus dem erwärmten Kölbchen vorsichtig mit einem Blasebalg abgeblasen. Der Kolben wird bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

Die isolierten Basen sind nicht rein weiß, sondern ziemlich braun gefärbt. Theobromin kann selbst durch Perforation nur schwer einer alkalischen Lösung entzogen werden. Bei unseren Versuchen ist jeweils 10 Stunden perforiert worden. Zudem ist auch hier wieder sodafreie Magnesia usta zu verwenden, weil

sonst das Coffein angegriffen wird. Der Verlust macht sich prozentual infolge der geringen Menge dieser Base allerdings wenig geltend.

Kreutz⁵⁵ gibt 1908 ein Verfahren bekannt, das auf der Löslichkeit des Theobromins in Chloralalkoholat beruht. Er ändert dieses in der Folge für gerottete und geschälte Kakaobohnen ab und versucht auch eine Trennung von freien und glukosidisch gebundenen Xanthinbasen. Das Verfahren kann übergangen werden, da der Autor wenig übereinstimmende Resultate erhalten hat.

Camilla und Pertusi¹¹ publizieren 1913 folgendes Verfahren:

10 g der zu untersuchenden Droge werden $\frac{1}{2}$ Stunde mit einer Mischung von 150 cm³ Wasser und 50 cm³ n-Schwefelsäure gekocht, auf 500 cm³ aufgefüllt und heiß filtriert. 250 cm³ des erkalteten Filtrates werden mit gebrannter Magnesia neutralisiert, auf dem Wasserbad auf 80 cm³ eingedampft und nach Ansäuerung mit verdünnter Schwefelsäure in einem geeigneten Perforationsapparat 2—3 Stunden mit Tetrachlorkohlenstoff extrahiert. Die Tetrachlorkohlenstofflösung wird unter Paraffinzusatz zur Trockene gebracht, der Rückstand mit schwefelsaurem Wasser mehrmals ausgekocht und die filtrierte Lösung mit derjenigen im Extraktionskolben vermischt. Unter Zusatz von 5 g Magnesia usta wird das ganze zur Trockene eingedampft und der Rückstand vier- bis fünfmal mit je 100 cm³ Chloroform ausgekocht. Die Basen sind meist genügend rein, können aber durch Aufnehmen in Wasser eventl. noch einer Kaliumpermanganat-Reinigung unterworfen werden.

Der kritische Punkt dieses Verfahrens liegt im Auskochen des trockenen Magnesiarrückstandes mit Chloroform.

Savini⁷⁹ bestimmt Theobromin in Kakao und Schokolade nach folgendem Verfahren:

12 g Kakao oder Schokoladenpulver werden in einem 500 cm³-Kolben mit 70 cm³ leicht siedendem Petroläther 10 Minuten auf dem Wasserbad gekocht, die warme Lösung wird abfiltriert und das gleiche Verfahren noch zweimal wiederholt. Filter und Inhalt werden im verwendeten Kolben zur Vertreibung des Petroläthers kurze Zeit erwärmt, mit 5 cm³ 10%iger Schwefelsäure und 250 cm³ Wasser unter Rückfluß eine Stunde gekocht, warm in einen 300 cm³-Kolben übergeführt und bei 30° bis zur Marke aufgefüllt. 250 cm³ Filtrat entsprechend 10 g Ausgangsmaterial werden mit 10 g Sand und wenig Magnesiumoxyd zur Sirupdicke eingedampft und noch 8—10 g MgO hinzugegeben; nach vollständigem Trocknen pulverisiert man das Gemenge. Die Masse wird mit 100 cm³ Chloroform und 5 cm³ Wasser und 0,25 cm³ konz. Ammoniak unter Rückfluß $\frac{1}{4}$ Stunde gekocht, die Lösung heiß durch ein getrocknetes Filter gegossen und der Rückstand noch drei- bis viermal in gleicher Weise behandelt.

Der Rückstand wird getrocknet, zweimal mit je 5 cm³ Petroläther ausgezogen, in wenig siedendem Wasser gelöst, filtriert und in gewogener Platinschale nach Auswaschen des Kolbens mit siedendem Wasser eingedampft. Nach Abdampfen wird bei 100° getrocknet.

Petrolätherverwendung bedingt wie bei den bei Dekker erwähnten Methoden einen Coffeinverlust.

Débourdeaux¹⁵ bestimmt Theobromin in Kakao nach folgender, mehr präparativen Methode:

100 g Kakao werden mit 40 cm³ Wasser verrieben. Die Mischung wird mit einer Lösung von 60 g kristallisiertem Phenol in 340 g Chloroform unter Rückfluß zwei Stunden gekocht. Die Lösung wird abfiltriert und der Rückstand noch zweimal mit je 300 g Chloroform und 50 g Phenol je eine Stunde gekocht. Man filtriert die vereinigten Lösungen in einen 2 Liter-Kolben (A) und destilliert das Lösungsmittel ab. Zum phenolhaltigen Rückstand gibt man 900 g Äther und läßt nach kräftigem Umschütteln über Nacht stehen. Das Theobromin fällt aus, während Coffein, Fett und der größte Teil des Farbstoffes in Lösung gehen. Der Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt, der Kolben A mit Äther nachgespült und der Niederschlag mit einer Mischung von 20 g Schwefelsäure 66° Bé und 180 cm³ Wasser in A hineinfltriert. Die Lösung wird einige Minuten aufgeköcht und in einen Literkolben B, der 250 cm³ Ammoniak enthält, filtriert. A und Filter werden zunächst mit 7,5 g Schwefelsäure und 142,5 cm³ Wasser, hierauf mit 150 cm³ siedendem Wasser und 30 Tropfen Schwefelsäure nachgewaschen. Die ammoniakalische Flüssigkeit wird mit 30 g Silbernitrat in einer Porzellanschale auf dem Wasserbad bis zum Verschwinden des Ammoniakgeruches eingedampft und über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag von Theobrominsilber wird abfiltriert, mit 250 cm³ Wasser gewaschen, mit 50 cm³ Wasser in einen Kolben gebracht und nach Sättigen des Luftraumes mit Schwefelwasserstoff über Nacht stehen gelassen. Das Theobromin wird mit 600 g Amylalkohol aufgenommen, der Niederschlag abfiltriert, das Filter zweimal mit je 100 g siedendem Amylalkohol ausgewaschen und das Filtrat bei 15° 12—15 Stunden zur Kristallisation beiseite gestellt. Das Theobromin wird auf gewogenem Filter gesammelt, mit Äther gewaschen und bei 100° getrocknet. Dem Resultat sind für je 100 g abfiltrierten Amylalkohols 0,02 g Theobromin hinzuzurechnen.

Das Verfahren ist wohl das komplizierteste der bisher beschriebenen.

Wadsworth⁹⁴ bestimmt Theobromin in Kakao folgendermaßen:

10 g Substanz werden mit 2—3 g frisch gebrannter Magnesia in einem Porzellantiegel gut gemischt, mit 14 cm³ Wasser versetzt und auf dem Wasserbad $\frac{1}{2}$ Stunde erwärmt. Es soll an keiner Stelle ein Eintrocknen erfolgen. Die Masse wird in einem 250 cm³-Kolben mit 150 cm³ Tetrachloräthan $\frac{1}{2}$ Stunde am Rückflußkühler erhitzt, die Lösung siedend heiß filtriert und

der Rückstand ausgewaschen. Man kocht nochmals 20—30 Minuten mit 120 cm³ Tetrachloräthan, filtriert zur ersten Lösung und wäscht wiederum nach. Das ganze wird auf 3—4 cm³ eingeengt und nach Abkühlen mit 60—70 cm³ Äther (D = 0,720) versetzt. Man läßt über Nacht stehen. Das ausgeschiedene Theobromin wird auf einem gewogenen Filter gesammelt, mit Äther gewaschen und nach Trocknen bei 100° gewogen. Dem gefundenen Werte ist eine Korrektur von 0,004 g zu addieren.

Das Verfahren läßt Coffein unberücksichtigt und ist meines Wissens nicht nachgeprüft. Die Originalarbeit war mir nicht zugänglich.

Unmittelbar vor dem Abschluß der vorliegenden Arbeit veröffentlicht Trifon Ugarte⁹⁰ eine Methode der Theobrominbestimmung in Kakao, die auf dem gleichen Prinzip beruht wie die Methode der Coffeinbestimmung in Tee, Kaffee, Mate, Kola und Guarana⁸⁹. Er gibt folgende genaue Vorschrift:

Man wägt 0,5 g rohes oder geröstetes Kakaopulver und bringt dasselbe in einen trockenen Kjeldahlkolben von 500 cm³ Inhalt. Mit einem feinen Pinsel werden alle Kakaoteilchen, die sich auf dem Wägegläschen oder im Halse des Kjeldahlkolbens befinden, restlos mitgenommen. Man sammelt die gesamte Substanz auf möglichst engem Raume am Grunde des Kolbens, was durch leichtes Schlagen mit der Hand erreicht wird. Mit einer 2—3 cm langen Oxydationsflamme beginnt man die Verbrennung in der Mitte des Substanzhäufchens. Durch Wegziehen der Flamme läßt man die entstehenden weißen Dämpfe in den Kolben zurückfallen. Ein zwei- bis dreimaliges Hin- und Herbewegen genügt, um die Masse gleichmäßig zu verkohlen. Man läßt während ungefähr fünf Minuten erkalten und gibt 10 cm³ destilliertes Wasser hinzu, die man der Wand des Kolbens entlang hinunterlaufen läßt. Man hält zirka zwei Minuten im Sieden, benetzt die ganze innere Fläche des Kolbens und filtriert durch ein quantitatives Filter von 11 cm Durchmesser in eine Kristallisierschale von 7 cm Durchmesser und 2 cm Höhe. Kolben und Filter werden mit zweimal je 10 cm³ Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wird auf dem Wasserbade zum Trocknen eingedampft. Der Rückstand wird zweimal mit je 5 cm³ absolutem Alkohol behandelt. Man rührt leicht um und dekantiert vorsichtig. Letzte Spuren Alkohol entfernt man auf dem Wasserbade.

Man fügt 3 cm³ destilliertes Wasser und zwei Tropfen n-Ammoniak zum Rückstand und bringt ihn durch Umrühren mit einem an einem Ende abgeplatteten Glasstab in Lösung oder Suspension. Man gibt 15 cm³ Chloroform hinzu und bringt durch fünf Minuten langes Umrühren den größten Teil des Theobromins in Lösung. Die gesamte Flüssigkeit wird auf ein doppeltes Filter fallen gelassen. Das innere Filter ist ein quantitatives Filter von 11 cm³ Durchmesser, während das äußere von gleichem Durchmesser ein solches gebräuchlicher Art ist. Vor dem Aufgießen werden die Filter mit 5 cm³ Chloroform befeuchtet. Das Trichterchen wird mit einem Uhrglas be-

deckt, und die Chloroformlösung in einem Kölbchen von 100 – 150 cm³ Inhalt aufgefangen. Kristallisierschale und Glasstab werden noch mit 10 cm³ und zweimal mit je 5 cm³ Chloroform unter stetem Umrühren nachgewaschen und die Flüssigkeit in Massen auf das Filter gebracht. Das doppelte Filter wird mit ca. 5 cm³ Chloroform nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird abdestilliert.

Der weißliche Rückstand wird in 5 cm³ destilliertem Wasser aufgenommen und das Ganze unter öfterem Umschütteln drei Minuten auf dem Wasserbade erwärmt. Man filtriert durch ein quantitatives Filter von 5–6 cm Durchmesser. Das Filtrat wird auf einem mit Alkohol und Äther gewaschenem, tariertem Uhrglas von ca. 7,5 cm Durchmesser gesammelt. Kolben und Filter werden zweimal mit je 3 cm³ Wasser unter zwei Minuten dauerndem Erwärmen auf dem Wasserbade nachgewaschen. Die Lösung wird auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand während fünf Minuten bei 100 – 105° getrocknet. Man läßt im Exsikkator erkalten und wägt.

Der Autor gibt in seinen Resultaten keine Doppel- und zudem auch keine Vergleichsanalysen.

Bei der Schwerlöslichkeit des Theobromins sind Verluste wohl kaum zu vermeiden. Coffein wird nicht berücksichtigt.

2. Titrimetrische Theobrominbestimmung.

a) Kjeldahl-Bestimmung.

Wird Theobromin allein bestimmt, so kann die Reinheit desselben durch eine Stickstoffbestimmung kontrolliert werden (Theobromin = N · 3,2155). Bei geringen Mengen Coffein, die Theobromin begleiten, kann diese ohne erheblichen Fehler auch ausgeführt werden. Bei einer theoretischen Annahme eines Verhältnisses 1:10 errechnet sich die prozentuale Differenz des Resultates bei einem Gesamtalkaloidgehalt von 2% unter Benutzung des Theobrominfaktors, ausgehend von 5 g Substanz, zu 0,015%.

b) Jodometrische Bestimmung.

Ein solches Verfahren ist bei der Droge bis jetzt nicht in Anwendung gekommen, doch haben Emery und Spencer²¹ eine jodometrische Theobrominbestimmung in Salzgemischen (Theobromino-Natrium aceticum, Theobromino-Natrium salicylicum) ausgearbeitet.

c) Elektrotitrimetrische Bestimmung.

Kolthoff⁵³⁾ hat reines Theobromin, in Natronlauge gelöst, konduktometrisch mit Salzsäure zurücktitriert.

III. Zusammenfassende Beurteilung der bisherigen makrochemischen Coffein- und Theobromin-Bestimmungsmethoden.

Übersieht man die neueren Arbeiten über makrochemische Alkaloidbestimmungen bei Purindrogen und zieht die veröffentlichten Analysenresultate in Betracht, so treten einzelne Verfahren hervor, deren Anwendung sich bei einer Drogengattung als zweckmäßig erweist. Die Methode ist dem Objekt anzupassen. Ein generelles Verfahren für sämtliche Coffeindrogen (ausgenommen Kakao), wie es dasjenige von Power und Chesnut darstellt, erweist sich in einzelnen Fällen als unnötig kompliziert. Für rohen Kaffee und Tee ist im Katz-Büttenbergischen Verfahren eine relativ einfache und gute Resultate zeitigende Bestimmung gegeben, die für Kola und Guarana leicht den Verhältnissen entsprechend modifiziert werden kann. [Aufnehmen des Chloroform-Destillationsrückstandes in einem größeren Quantum (70 bis 80 cm³) schwacher Säurelösung, Konzentrieren, heiß Filtrieren und Perforieren]. Bei gebranntem Kaffee erhält man nach Lendrich-Nottbohm das reinste Coffein, wenn auch bei kleinen Coffeinemengen eine Stickstoffbestimmung erforderlich wird. Gut brauchbar ist auch das Katzsche Verfahren. Bei sogen. „coffeinfreiem“ und „coffeinarmem“ Kaffee kommt die Hilger-Juckenack-Wimmersche Methode in Betracht. Mate gehört in bezug auf die einzuschlagenden Reinigungsmethoden infolge seiner Erntebereitung (z. T. Trocknen über freiem Feuer) und seines Gehaltes an Harz- und Wachsbestandteilen in die Gruppe des gebrannten Kaffees.

Bei den Kakao-Theobromin-Coffeinbestimmungen gibt das Verfahren von Prochnow untereinander gut übereinstimmende

Resultate. Das Alkaloidgemisch ist allerdings nicht rein weiß, sondern ziemlich bräunlich gefärbt. Einfach ist die Theobrominbestimmung nach Wadsworth. Sie vernachlässigt allerdings Coffein. Die Methode ist meines Wissens bis jetzt nicht nachgeprüft worden.

Was die Aufspaltung der Coffein- resp. Theobrominverbindungen, wie sie in den Drogen vorliegen, betrifft, so läßt sich vielleicht folgendes sagen: Genaue Einblicke in die Aufspaltung werden erst möglich, wenn wir diese komplizierten Verbindungen einmal genau kennen. Für die Coffein-Gerbstoffverbindungen in Tee und Mate sowie für das coffein-chlorogensaure Kali des Kaffees genügt zur Spaltung Wasser, wenn man dieses eine Zeitlang einwirken läßt. Schneller wirkt Ammoniak. Für Kola, Guarana und Kakao scheint die übliche Ammoniakwirkung zur Spaltung nicht zu genügen.

Generell ist festzuhalten, daß mit Alkalien äußerst vorsichtig gearbeitet werden soll, besonders in Fällen, wo ein Kochen notwendig wird. Coffein ist weit säurebeständiger als alkalifester. Die Magnesiummethoden sind insofern mit Vorsicht zu gebrauchen, als die Handelspräparate von gebrannter Magnesia meistens sodahaltig sind.

Die auf den ersten Blick bestechenden Sublimationsmethoden weisen bei näherer Prüfung einige Mängel auf. Die Apparaturen lassen zu wünschen übrig. Burmann⁹ und Polenske⁶⁸ — der zur Bestimmung von Benzoesäure in *Vaccinium Vitis Idaeae* ähnlich wie Burmann vorgeht — müssen ihre Apparate zur Weiterführung der Analyse zerstören. Die Philippsche Apparatur⁶⁷ scheint auch nicht ganz glücklich gewählt zu sein. Die Sublimation erfolgt hier in einem in sich abgeschlossenen Raum über freiem Feuer ohne genaue Temperaturregulierungsmöglichkeit. Es wird eine Verkohlung und trockene Destillation vorhandener Verunreinigungen und dadurch Beeinflussung des Resultates nicht zu vermeiden sein — wie denn auch Vauthiers Mitteilungen bestätigen —, wenn die durch die Analyse mitgenommenen Verunreinigungen im Verhältnis zu den kleinen Coffeinemengen groß werden. Ein weiterer Übelstand besteht in der relativ langen

Zeit, die notwendig wird, um Mengen von 0,1 g Coffein, wie sie beim Philippschen Verfahren in Betracht kommen, zu sublimieren. Polenske sublimiert während vier Stunden im Ölbad bei 224°, um Mengen von 0,1 g Benzoesäure zu erhalten. Fendler und Stüber haben bei dem Burmannschen Verhältnissen für 70 mg eine Sublimationsdauer von sechs Stunden nachgewiesen. Es ergibt sich also trotz der guten Sublimationsfähigkeit des Coffeins eine praktisch geringe Sublimationsgeschwindigkeit, d. h. die in der Zeiteinheit übergehende Menge ist klein. So hat keine der bisherigen Sublimationsmethoden allgemeine Verwendung finden können.

B. Neue gravimetrische Mikrobestimmungsmethode für Coffein und Coffein-Theobromin in Drogen.

Wenn trotz den im vorangehenden Kapitel beschriebenen, mißglückten Versuchen der Verwendung der Sublimation bei bisherigen, gravimetrischen Coffeinbestimmungen nachfolgend erneut die Ausarbeitung einer Sublimationsmethode versucht wurde, so geschah es aus folgenden Gründen.

Trotz der Verwendung verschiedenartiger Reinigungsmethoden und reiner Reagentien ist es nach bisherigen Erfahrungen nicht möglich, bei einem gravimetrischen, mikrochemischen Verfahren die Basen so weitgehend von mitgeschleppten Verunreinigungen zu befreien, daß letztere das Resultat nicht erheblich fälschen. Versuche haben jedoch gezeigt, daß dies bei Verwendung der Sublimation als letzter Reinigungsoperation möglich ist.

Dieses Vorgehen hat zudem den Vorteil, eine zweckmäßige Trocknungsmethode für Coffein zu sein. Aus Wasser kristallisiertes Coffein enthält ein Molekül Kristallwasser. Beim Trocknen der Base bei 95—100° tritt schon teilweise Verflüchtigung ein. Durch Sublimation erhält man Coffein wasserfrei. Unter geeigneten Bedingungen gelingt es, Coffein quantitativ zu sublimieren.

Die Mißerfolge makrochemischer Sublimationsmethoden sind nicht zuletzt auf die mangelhafte Apparatur sowie ungeeignete Sublimationsbedingungen zurückzuführen.

Folgende Fragen haben sich bei genauer Prüfung der Verwendung der Sublimation für eine gewichtsanalytische, mikrochemische Bestimmung der Xanthinbasen in Purindrogen aufgedrängt: Welches ist ein geeigneter Apparat zur Sublimation, der in Verbindung mit der Kuhlmannschen Mikrowage gebraucht werden kann? Inwieweit ist es vorteilhaft, sich bei der Sublimation des verminderten Druckes zu bedienen? Wie gestaltet sich die Bestimmung der beiden Basen Coffein und Theobromin in Anwendung auf die Purindrogen? Inwieweit ist eine Reinigung der extrahierten Alkaloide notwendig? Kann eventuell aus der Droge direkt sublimiert werden. Welche Mengen Ausgangsmaterial sind anzuwenden, um den makrochemischen Resultaten entsprechende, gleich genaue mikrochemische zu erhalten? Läßt sich eine Methode finden, die soweit anpassungsfähig ist, daß Bestimmungen an einzelnen Organen einer Pflanze, an einem Kaffee-, Kola- oder Kakaosamen, einem Tee- oder Mateblatt, durchgeführt werden können? Welches sind die Fehlergrenzen?

I. Apparatur zur quantitativen Mikrosublimation und Sublimationsverhältnisse von Coffein und Theobromin.

Versteht man unter Sublimation die Verdampfung eines festen Körpers und die Kondensation seiner Dämpfe — wie es Eder²⁰ präzisiert hat — so müssen an einen Apparat, der quantitativen Verhältnissen entsprechen soll, verschiedene Bedingungen gestellt werden. Er muß so zerlegbar sein, daß sowohl das das Sublimationsgut aufnehmende Gefäß, wie auch der „Kondensator“ auf der Mikrowage gewogen werden können. Der Größe wird durch die Maximalbelastung bei der Kuhlmannschen Wage mit 20 g eine Grenze gezogen. Das Apparätchen muß gestatten, im Vakuum bei erhöhter Temperatur quantitativ zu sublimieren. Von den in der Literatur beschriebenen Apparaten (Rieber⁷⁴, Kempf⁵², Christopher¹³, Diepolder¹⁸) entspricht keiner ganz den Be-

dingungen. In der Folge hat ein Apparätchen, dem als Vorbild der Diepoldersche Apparat diente, zufriedenstellende Dienste geleistet.

Das Apparätchen besteht aus einem kleinen Becherchen von ca. 2 cm Höhe und 1,5 cm Durchmesser, welches mittelst eines Schliffes mit einer Glasröhre verbunden werden kann, die zum Auffangen des Sublimates bestimmt ist (Kondensator). Letztere ist so konstruiert, daß sie bequem auf die Aufhängevorrichtung der Kuhlmannschen Wage gelegt und ausbalanciert werden kann. Um Gewicht und Oberfläche möglichst klein zu halten und eine möglichst vollständige Kondensation der Dämpfe zu erzielen, wurde der Kondensator über dem trichterförmigen, untersten Teil verengert. Kleinheit der Oberfläche ist ein sehr wesentliches Moment für die Gewichtskonstanz der Gefäße. Der obere, zur Kugel geformte Teil dient zur besseren Gewichtsverteilung auf der Wage und die umgebogene Stelle als Angriffshaken zur Herausnahme des ganzen Apparätchens. Der glockenförmige Teil des Kondensators und das Becherchen sind

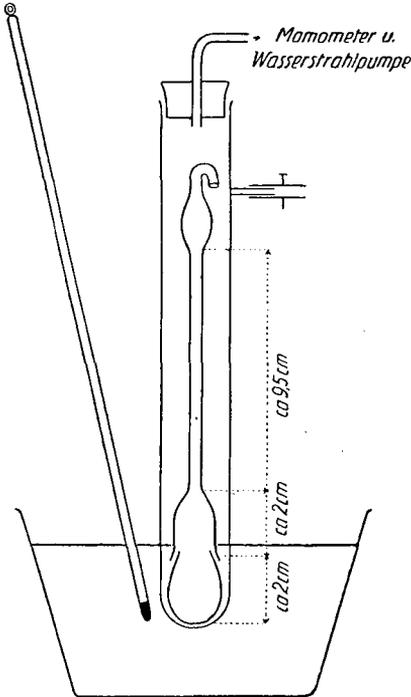


Fig. 2. Sublimationsapparatur.

durch einen Schliff miteinander verbunden. Die übereinanderliegenden Schliffflächen dürfen nicht höher als etwa 5 mm sein. Da die Schliffe nie vollkommen aufeinander passen, so wird mit einer minimalen Menge Graphit gedichtet. Durch gutes Ineinanderreiben wird dieser dem Glase so fein aufgetragen, daß beim Zu-

sammenstellen und Auseinandernehmen Gewichtsveränderungen von Belang höchst selten vorkommen. Graphit darf nur in dem Maße Verwendung finden, daß keine zusammenhängende, abschilfernde Kruste entsteht. Schließt die Dichtung nicht vollständig, so findet Kondensation an der Innenfläche des äußeren Reagenzrohres statt, und der Beschlag kann durch Inspektion von oben auf schwarzer Grundlage leicht wahrgenommen werden. Der Kondensator mit eingestecktem Becherchen wird in ein eng anschließendes Reagenzglas eingeführt, das oben durch einen Kautschukstopfen mit Glasrohr unter Zwischenschaltung einer Sicherheitsflasche mit Manometer und Wasserstrahlpumpe in Verbindung steht. Seitlich am Reagenzrohr befindet sich ein kurzes Ansatzrohr mit Gummischlauch-Quetschhahnverschluß zum Erzeugen und Aufheben des Vakuums. Zur Regulierung der Temperatur benutzt man ein Ölbad, in welches die Apparatur nebst einem Thermometer bis zur Höhe des Nöpfchens eingesenkt wird.

Die Frage nach der Gewichtskonstanz der beiden auseinanderzunehmenden und getrennt zu wägenden Bestandteile der Apparatur (Becherchen und Kondensator) ergibt unter Benutzung der Kuhlmannschen Mikrowage analoge Verhältnisse, wie sie Lieb⁶⁹ festgestellt hat. Bei der Notwendigkeit des Klimaausgleiches ist zu erwarten, daß die Gewichtsschwankungen proportional der Oberfläche der zu wägenden Gegenstände sich verhalten. Die Gewichtskonstanz der leeren Apparateile wurde durch Aussetzen derselben an verschiedene Temperatur- und Vakuumverhältnisse geprüft. Der kleine Becher hat sich konstanter erwiesen als die weit größere Auffangröhre. Unter 33 Wägungen sind nur drei mit höheren Differenzen als 0,01 mg (0,012 — 0,013 — 0,019). Alle übrigen liegen unterhalb dieser Größen, z. T. sind sie absolut übereinstimmend. Die Gewichts-differenzen der Auffangröhre haben sich durch folgende Maßnahmen so weit zurückdrängen lassen, daß mit ihnen gearbeitet werden konnte (0,009 — 0,006 — 0,004 — 0,012 mg). Von einem Abreiben, wie es Pregl⁷⁰ bei seinem Absorptionsapparätchen in der Mikroanalyse vornimmt, ist Abstand genommen worden. Zum Anfassen, Ineinanderpassen und

Auseinandernehmen hat sich feinstes, schwedisches Seidenpapier als zweckmäßig erwiesen. Man vermeidet am besten jede direkte Berührung mit den Fingern. Man läßt nach Auseinandernehmen des Apparätchens im Chlorcalciumexsikkator 20 bis 30 Minuten erkalten, läßt im Wägezimmer 10 Minuten offen stehen und wägt nach weiterem Klimaausgleich in der Wage. Größere Wägedifferenzen treten auf, wenn Wägungen an aufeinanderfolgenden Tagen bei veränderten Luftverhältnissen vorgenommen werden (Schwankungen bis zu 0,05 — 0,06 mg). Die Analyse muß am gleichen Tage zu Ende geführt werden. Sie kann innerhalb einer Zeit durchgeführt werden (3—4 Stunden für die ganze Analyse, $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden für die beiden Mikrowägungen und die Sublimation), während welcher die meteorologischen Verhältnisse sich im allgemeinen nicht so stark ändern. Das Gewicht eines am Vortag gewogenen Gefäßes ist im allgemeinen am folgenden Tage als nicht konstant zu betrachten und für eine neue Analyse nach erneutem Aussetzen an die entsprechenden Temperatur- und Vakuumverhältnisse neu zu bestimmen.

Durch Anwendung des Vakuums kann die Sublimation unter gewissen Bedingungen zu einem wirklichen Reinigungsprozeß umgestaltet werden, indem eine ganze Reihe Fehler der bei gewöhnlichem Druck vorgenommenen Sublimation wegfallen. Durch die Arbeiten von Krafft⁵⁴, Weilandt⁹⁷, Kempf⁵², Eder²⁰ u. a. ist auf die Vorzüge der Vakuumsublimation hingewiesen worden, durch welche es in die Hand gegeben wird, bei relativ niedriger Temperatur durch langsames Verdunstenlassen einer festen Substanz (Sublimieren) ein sehr reines Produkt in quantitativer Ausbeute selbst aus Gemischen heraus zu erhalten. Wie Kempf⁵² in seiner Arbeit ausführt, handelt es sich bei Sublimationsvorgängen um die Erscheinung des Verdunstens, was theoretisch den Rückschluß zuläßt, das das Phänomen für jeden Körper in Erscheinung treten sollte, sofern die Temperatur nicht eine solche des absoluten Nullpunktes ist. Daß dem nicht so ist, hat seinen Grund in der sehr verschiedenen Sublimationsgeschwindigkeit der Körper. Für die Verdunstungs-

geschwindigkeit von Flüssigkeiten hat Stefan⁸² die folgende Formel aufgestellt:

$$v = K \log \frac{p}{p-p'},$$

wo p den Atmosphärendruck und p' den Dampfdruck bedeutet. Bei kleinem p' wird angenähert v :

$$v = K \frac{p'}{p},$$

d. h. die Geschwindigkeit ist dem Dampfdruck direkt, dem Luftdruck umgekehrt proportional. Die Sublimationsgeschwindigkeit ist definiert durch die in der Zeiteinheit sublimierende Menge und kann in Proportionalität zu weiteren Faktoren gebracht werden. Sie ist um so größer, je höher die absolute Temperatur, je größer die zugeführte Wärmemenge und je größer die Oberfläche ist, wobei noch als weiterer Faktor die für jeden Körper verschiedene Diffusionsgeschwindigkeit seines Dampfes gegenüber der des vorhandenen Gases, das den Außendruck darstellt, hinzukommt. Als letzte Beziehung ergibt sich die Abhängigkeit von den Molekulargewichten der beiden ineinander diffundierenden Stoffe. Kempf hat aus der Proportionalität der Sublimationsgeschwindigkeit mit der Oberfläche des verdunstenden Körpers geschlossen, daß dieselbe am Ende des Vorganges unendlich klein wird und er hat deshalb seine Versuche nach einer gewissen Zeitdauer unterbrochen. Theoretisch kann wohl so gefolgert werden, praktisch ist es aber dennoch möglich, quantitativ zu sublimieren, da die Wage diese theoretisch gefolgerten kleinen Mengen nicht mehr anzugeben vermag.

Über die speziellen Sublimationsverhältnisse bei Coffein und Theobromin ist kurz folgendes zu sagen. Coffein fängt bei einer Badtemperatur von 70° bei 10—11 mm Druck merklich zu sublimieren an, während Theobromin erst wesentlich höher, bei 125°, sich merklich verflüchtigt. Da im folgenden mittelst der Sublimation auch eine Reinigung bezweckt wird und eine solche um so erfolgreicher ist, je langsamer man verdunsten läßt, so würde man am besten bei möglichst niedriger Temperatur

sublimieren. Doch ist dann die Sublimationsgeschwindigkeit so klein, daß auch geringe Mengen von 1—10 mg Substanz nicht in praktisch zweckdienlicher Zeit vollständig sublimiert werden können. Ferner macht sich bei allzu niedrig gehaltener Sublimationstemperatur ein Übelstand der benutzten Apparatur geltend, indem eine völlig gleichmäßige Wärmezufuhr infolge der nicht gleichmäßig aufeinanderliegenden Doppelwandung nicht möglich ist. Trotzdem der Steighöhe der Dämpfe wenig zugemutet wird, kann bei niedrig gehaltener Temperatur und nicht genügend eingesenktem Apparätchen schon der obere Teil des Nöpfchens als Kondensator wirken, und so die Dauer des Sublimationsvorganges wesentlich verlängert werden.

Durch Herausnehmen der Apparatur aus dem Ölbad konnte in den folgenden Versuchen meist ohne Schwierigkeit festgestellt werden, wie weit die Sublimation gediehen war. Durch quantitative Sublimationsversuche wurden nun auch die Zeiten bestimmt, innerhalb welcher gewisse Mengen Coffein resp. Theobromin sublimieren. Damit waren auch Anhaltspunkte gegeben für die Sublimationsdauer bei den nachfolgend zu beschreibenden Bestimmungen der Purinbasen in Drogen. Als kleiner Übelstand machte sich bei diesen Bestimmungen der folgende bemerkbar: Beim Abdampfen der Alkaloidlösung im Becherchen des Sublimationsapparates verbleibt der Verdunstungsrückstand nicht gleichmäßig über die Innenfläche verteilt, sondern häuft sich in kleinen Ringen an, wodurch natürlich die Sublimationsdauer etwas verlängert wird. Als praktisch beendet kann die Sublimation angenommen werden, wenn der untere Rand des Sublimates, der zuerst keine scharfe Grenzlinie bildet, sich nach oben verschiebt und scharf wird. Der Kondensator des Sublimationsapparates kann ohne Reinigung zur Aufnahme weiterer Sublimate in nachfolgenden Versuchen benutzt werden. Das Becherchen wird nach jeder Sublimation zweckmäßig gründlich gereinigt.

Um einen Einblick in die Sublimationsgeschwindigkeit und ihre Abhängigkeit von der Temperatur zu erhalten, sind quantitative Versuche mit approximativer Genauigkeit unternommen worden. In einem bestimmten Volumen Lösungsmittel wurde

eine bestimmte Menge Coffein resp. Theobromin gelöst. Ein aliquoter Teil der Lösung wurde im Becherglas verdunstet und zur Sublimation verwendet.

Angewandte Menge Coffein (m) mg	Druck mm	Temperatur	Zur Sublimation der Gesamtmenge nötige Zeit (t) Minuten	$\frac{m}{t} = v$
1,3	10—13	123°—135°	35	ca. 0,04
6,5	10—13	115°—125°	180	ca. 0,04
4,0	10—13	127°—140°	70	ca. 0,06
3,2	10—13	143°—152°	40	ca. 0,08
3,2	10—13	162°—165°	10	ca. 0,32
6,5	10—13	154°—168°	20	ca. 0,32

Bei diesen rein approximativen Zahlen läßt sich immerhin erkennen, daß bei diesen Sublimationsbedingungen bei steigender Temperatur der Dampfdruck des sublimierenden Körpers rascher zunimmt als die Temperatur (analog der Dampfdruckkurve des Wassers).

Für die praktische Verwendung der Coffeinsublimationen bei meinen Bestimmungsmethoden für Drogen hat sich mir bei einem Drucke von 10—13 mm das Temperaturintervall von 160—170° als das geeignetste herausgestellt. Der Prozeß wird so in relativ kurzer Zeit zu Ende geführt und das Sublimat fällt noch so feinkristallinisch aus, daß ein Auswachsen zu größeren, am Kondensator nicht mehr festhaftenden Konglomeraten vermieden wird. Bei 180° und höher treten häufig große Nadeln auf, die frei in den Raum hinauswachsen und eventl. zurückfallen könnten.

Mit obigen Angaben nicht direkt vergleichbar, aber doch in naher Beziehung stehend sind die Angaben von Kempf⁵², der für seinen Heißluft-Sublimationsapparat ebenfalls approximativ-quantitative Werte bestimmt hat, und ferner die übereinstimmenden Angaben von du Pasquier⁶⁵ und Puckner⁷² über Gewichtsverluste des Coffeins beim Trocknen bei 100°, sowie die Angaben von Fendler und Stüber bei der Kritik der Burmannschen Sublimationsmethode²³.

	Ange- wandte Menge	Druck mm	Temperatur	Subl. Dauer (t) Min.	Subl. Menge (m) g	$v = \frac{m}{t}$
Kempf	0,23 g Coffein	1	160°—165°	35	0,2	0,006
	17 g Thee	12	210°	60	0,11	0,002
	1 g Thee	0,9	160°—165°	60	0,005	0,00008
Pasquier und Puckner	0,125 g Coffein	Atm.-Druck	100°	60	0,0005	0,000008
Fendler und Stüber	0,007 g	Atm.-Druck	225°	300	0,007	0,0002

Für Theobromin gestaltet sich die Übersicht analog. 0,15 g Theobromin wurden in 30 cm³ 2%igem Phenolchloroform gelöst. Ein aliquoter Teil wurde im Becherglas verdunstet, das Phenol abgeblasen und der Rückstand vollständig sublimiert.

Angewandte Menge (m) mg	Druck mm	Temperatur	Zeit (t) Minuten	$\frac{m}{t} = v$
1,0	12	165°—175°	120	0,008
1,0	12	192°—198°	20	0,05
2,0	12	192°—197°	30	0,06
4,0	12	200°—210°	20	0,2

Kempf gibt folgendes an:

Sublimierte Menge 3,62 g bei Ausgangs- menge von 5 g . . .	11	260°	105	34,4
--	----	------	-----	------

Als praktische Sublimationstemperatur für Theobromin ist bei den nachfolgend beschriebenen Bestimmungsmethoden bei einem Druck von 10—13 mm das Temperaturintervall von 200—210° gewählt worden.

In Anwendung auf Drogen ist die Sublimationsdauer je nach Fall von $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde variiert worden, je nach der zu erwartenden Menge, dem Verhalten des unteren Randes des Sublimates und dem Rückstand im Sublimationsbecherchen.

Unter diesen praktisch zweckmäßigen Bedingungen (10 bis 13 mm Druck und Sublimationstemperatur von $160-170^\circ$ für Coffein resp. $200-210^\circ$ bei Theobromin) wurden nun quantitative Sublimationsversuche unternommen. Zur Verwendung gelangte ein im Diepolderschen Apparat einmalig vorsublimiertes, reines Handelscoffein.

	Im Becher abgewogenes Coffein mg	Wieder- gefundenes Coffein mg	%	Δ %	Absolutes Δ mg	
1.	1,591	1,582	93,3	-0,7	0,009	} $D = 1,4\%$ $D_{th} = 1,7\%$
2.	1,879	1,869	99,5	-0,5	0,010	
3.	1,450	1,461	100,7	+0,7	0,011	
4.	0,641	0,641	100,0	0,0	0,0	} $D = 0,8\%$ $D_{th} = 4,2\%$
5.	0,757	0,751	99,2	-0,8	0,006	

Aus der prozentigen Fehlerrechnung nach der Methode von Benedetti-Pichler⁷ ergibt sich als maximale Streuung eines Analysenergebnisses der folgende Wert:

$$D_{th} = \frac{2}{E} (P \cdot \Delta_E + 100 \cdot f \cdot \Delta_m),$$

wo D_{th} die maximale Streuung, E die Einwaage, Δ_E der Fehler der Einwaage, P der Prozentgehalt, f der Fehler des Umrechnungsfaktors und Δ_m der Fehler der Bestimmungsform darstellt. Im obigen Fall ist die Streuung ermittelt für eine Einwaage von 1,8 mg resp. 0,75 mg und als Δ_m wurde die höchste ermittelte Wägedifferenz der großen Auffangröhre aus den Resultaten der Konstanzwägungen mit 0,012 mg eingesetzt. Die theoretisch zu-

lässige maximale Streuung ist in beiden Fällen nicht überschritten worden.

Analoge Verhältnisse mit einem auf gleiche Weise gereinigten Handels-Theobromin zeigt die folgende Versuchsreihe:

	Im Becher abwogenes Theobromin in mg	Wieder- gefundenes Theobromin in mg	%	Δ %	Absolutes Δ in mg	
1.	1,139	1,131	99,3	-0,7	0,008	
2.	1,411	1,411	100,0	0,0	0,0	
3.	1,190	1,202	101,0	+1,0	0,012	D = 1,8%
4.	1,159	1,150	99,2	-0,8	0,009	D _{th} = 2,3%
5.	1,010	1,056	104,0	+4,0	0,046 *)	*) D = 4,8%
6.	2,309	2,312	100,1	+0,1	0,003	
7.	1,637	1,628	99,4	-0,6	0,009	*) D _{th} = 3,2%

Bei der fünften Sublimation ist irgend ein manueller Fehler unterlaufen, der mir entgangen ist. Die Streuung errechnet sich bei einer Durchschnittseinwage von 1,4 mg zu 2,3%, während die wirkliche mit Auslassung des fünften Fehlresultates eine solche von 1,8% ergibt. Die absoluten Mengedifferenzen erheben sich in allen Fällen mit Ausnahme des Fehlresultates nicht über die bei den Konstanzwägungen ermittelte, höchste Differenz von 0,012 mg. Bei größeren Einwägen würde der Fehler prozentual sich weiter zurückdrängen lassen.

II. Anwendung der gravimetrischen Mikromethode auf Drogen.

In Anwendung dieser Vorversuche auf die Gehaltsermittlung von Coffein und Theobromin in Drogen hat sich im Laufe der Arbeit ergeben, daß eine Menge weiterer Faktoren zu berücksichtigen sind, wenn die Resultate den Anforderungen der Genauigkeit genügen sollen. Ein einziges, schablonenhaftes Verfahren für

alle in Betracht kommenden Drogen hat sich nicht anwenden lassen, trotzdem natürlich im einzelnen gewisse Prozesse der Analyse sich wiederholen. Ausschlaggebend ist außer der Natur der Begleitstoffe (Wachs, Fett usw.) die Art der Bindung der Basen in den verschiedenen Purindrogen, die Erntebereitung (Mate) und die weitere Vorbehandlung der Droge (Rösten des Kaffees). Im Sinne der zunehmend schweren Spaltbarkeit der Alkaloidverbindungen läßt sich ungefähr eine natürliche Reihe Tee — Kaffee — gebrannter Kaffe — Mate — Kola — Guarana — Kakao festlegen, wobei sich ebenfalls ein Übergang von Coffein zu Coffein-Theobromin-Drogen ausdrückt. Gebrannter Kaffee liefert infolge seiner Röstprodukte neben Mate die am schwersten zu reinigenden Auszüge und bietet ein gutes Kriterium für die Leistungsfähigkeit einer Sublimationsmethode. *Ilex vomitoria* ist nicht in Betracht gezogen worden, der erwähnten Arbeit von Power und Chesnut⁶⁹ nach zu schließen, dürfte diese Droge zwischen Mate und Kola einzureihen sein. Kakao nimmt als vorwiegend theobrominhaltige Droge eine besondere Stellung ein, schließt aber, was schwere Spaltbarkeit der Alkaloidverbindungen betrifft, an Guarana an.

Eine Mikrocoffeinbestimmungsmethode, die sich der Sublimation bedient, wäre ideal zu nennen, wenn eine Sublimation, wie sie z. B. Kempf bei Tee vorgenommen hat, direkt aus der Droge quantitativ zum richtigen Werte führen würde. Er hat bei 17 g Tee als Ausgangsmaterial bei 210° und 12 mm während einer Stunde 0,11 g eines braunen Sublimates erhalten, das sich leicht aus Alkohol umkristallisieren ließ. Der wirkliche Gehalt der Droge an Coffein ist nicht angegeben. Der obige Wert entspricht nur ca. 0,65%, und es ist wohl anzunehmen, daß dieser nicht die Gesamtmenge an Coffein darstellt. Aus vorstehenden Angaben erhellt ohne weiteres, daß eine direkte Sublimation wenigstens bei Tee zu keinem genügenden Resultat wird führen können, da das Coffein nicht rein ist. Die weiteren Erfahrungen haben dann gezeigt, daß für die Zwecke quantitativer Bestimmung auch nicht irgend ein beliebiger Drogen-Auszug resp. dessen Rückstand der Sublimation unterworfen werden kann, sondern

daß eine weitgehende Reinigung der gewonnenen Auszüge nötig ist, und daß die Sublimation zweckmäßig nur als letzter Reinigungsprozeß verwendet wird.

Die Probeentnahme eines Durchschnittsmusters des zu untersuchenden Materials in Mengen von 0,1 — 0,2 — 0,3 g bietet, wie Benedetti-Pichler⁷ nachweist, keine Schwierigkeit, wenn nur für genügend feine Zerteilung gesorgt wird. Durch Trocknen, restloses Pulverisieren, Durchsieben und Mischen kann die Droge genügend fein zerteilt und gleichmäßig erhalten werden, so daß Schwankungen im Prozentgehalt sich nicht geltend machen.

Es wurden bei den nachfolgenden Bestimmungen als Analysenmaterialien lufttrockene Durchschnittspulver verwendet, da diese bei geeigneter Aufbewahrung gewichtskonstanter sind als die bei 100° getrockneten Drogen. In Fällen, bei denen die Resultate zu weiteren Zwecken verwendet werden, ist natürlich der Wassergehalt besonders festzustellen.

Es ist bei diesen Mikrobestimmungen allgemein so vorgegangen worden, daß nach der besten in der Literatur angegebenen Methode Makrobestimmungen ausgeführt und deren Resultate mit den mikrochemisch gewonnenen verglichen worden sind. Als Extraktionsmittel ist in allen Fällen mit Ausnahme des Kakao Chloroform gewählt worden, und zur raschen Spaltung der Verbindungen der Purinbasen wurde 10%iges Ammoniak benützt. Die zur Verwendung kommenden Lösungsmittel müssen natürlich rein sein.

Für Tee, rohen und gerösteten Kaffee, Mate und Kola konnte die gleiche Mikrobestimmungsmethode benutzt werden, während sie bei Guarana durch eine energische Aufspaltung modifiziert wurde. Kakao mußte wesentlich anders behandelt werden.

Tee.

Über den heutigen Stand der Chemie des Tees berichtet Tschirch ausführlich im dritten Band seines Handbuches der Pharmakognosie; quantitative Angaben über die Zusammensetzung

dieses Genußmittels finden sich außerdem in Königs Nahrungs- und Genußmittelchemie. Unter den alkaloidischen Inhaltsstoffen dominiert das Coffein; genaue Angaben über die Mengen der begleitenden Basen Theophyllin, Xanthin, Adenin und 3-Methylxanthin sind in der Literatur nicht zu finden. Bezüglich des Verhältnisses von Coffein und Theobromin zu den Nichtmethylpurinderivaten gibt v. Fellenberg²² einige Daten, die nach der Krüger-Schittenhelmschen Kupfersulfat-Bisulfitmethode gewonnen sind. Doch ist die Methode nicht so zuverlässig wie es wünschenswert wäre²⁶.

v. Fellenberg gibt folgende Zahlen:

	Trocken- substanz %	Coffein resp. Theobromin %	Sonstige Purinderivate %	
Gerösteter brasilianischer Kaffee . .	97,95	1,0—1,3	0,016	0,016
Chinesischer Tee . .	93,39	1—3	0,101	0,108
Mate	93,58	0,3—1,7	0,035	0,037
Kakao	94,04	1,3—1,7	0,041	0,043
Kakaoschalen	93,92	0,4—1,1	0,084	0,090

Bei Ausführung der Mikrobestimmung von Coffein in Tee wurde ein kleiner Scheidetrichter von 5—10 cm³ Inhalt der nebenstehenden Form (Fig. 3) benutzt, der auf der analytischen Wage tariert direkt zur Einwage des Ausgangsmaterials dienen kann. Zur Filtration bringt man in die verlängerte Partie oberhalb des Hahns einen Bausch Watte von solcher Größe, daß er eben noch in den erweiterten Teil hineinragt, damit nicht das feine Material im Hals eine schwer zu durchdringende Filterschicht bildet. Direkt oberhalb des Hahns muß die Watte ein bisschen gepreßt werden, damit nicht der ganze Bausch beim Schütteln den Halt verliert. Bei eventl. schlechter Filtration kann man das Lösungsmittel durchblasen. Ganz ideal ist dieser Extraktionsmodus nicht, doch läßt sich relativ gut damit arbeiten,

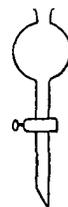


Fig. 3
Scheidetrichter.

wenn man die richtige Anwendung des Wattebausches gelernt hat. Durch wiederholtes Ausschütteln mit Chloroform und Abfließenlassen, wie Virchow⁹³ und Philipp⁶⁷ es bei ihren Bestimmungen machen, entzieht man der Droge das Coffein. Ein Arbeiten mit einem bestimmten Volumen und Abgießen eines aliquoten Teiles ist infolge der Flüchtigkeit des Extraktionsmittel besser zu vermeiden.

Die fein gepulverte Droge wird zuerst mit Chloroform durchfeuchtet unter nachherigem Zusatz von 2—3 Tropfen Ammoniak bei Mengen von 0,1 bis 0,2 g Droge. Bei der Prüfung auf Vollständigkeit der Extraktion zeigt es sich, daß bei fünfmaligem, je drei Minuten langem Ausschütteln mit den Mengen Chloroform, die durch die Größe des Trichterchens gegeben sind, die Droge praktisch erschöpft wird. Bei den zwei ersten Extraktionen wurde nach jeweiligem Abtropfen gleich mit je ca. 5 cm³ Lösungsmittel nachgewaschen. An der Außenseite des Ausflußrohres durch Verdunsten des Lösungsmittel auftretendes Coffein ist restlos mitzunehmen. Man bedient sich am besten zu diesem Nachspülen kleiner Pipetten. Die Vollständigkeit des Extraktionsvorgangs ließ sich in Vorversuchen leicht mikroskopisch verfolgen. Man dunstet je 1 cm³ der späteren Auszüge ein und gewinnt leicht ein Urteil über die zu vernachlässigenden Coffeinrückstände der letzten Auszüge. Durch Mikrosublimation auf der Asbestplatte nach Tunmann konnte auch die extrahierte Droge auf ihre praktisch vollständige Extraktion geprüft werden. Durch die Mikrowage lassen sich die Mengen des vierten und fünften Auszuges nicht mehr genau fassen.

Die vereinigten Auszüge werden in einem Erlenmeyerkölbchen vom Lösungsmittel befreit; der Rückstand wird zur vollständigen Entfernung des Ammoniaks und Chloroforms zwei- bis dreimal mit 2—3 cm³ absolutem Alkohol aufgenommen und das Lösungsmittel jeweils abgedampft. Es hat sich gezeigt, daß die völlige Entfernung von Ammoniak unbedingt nötig ist, da sonst Ammoniumsalze durch die ganze Analyse durchgehen und bei der Endsublimation ein zu hohes Resultat verursachen können. Der kristallinische, fast trockene Rückstand wird mit

einer kleinen Messerspitze voll sodafreier Magnesia usta versetzt, mit 2—3 cm³ heißem Wasser kurz aufgeköcht und durch ein kleines Filterchen in einen kleinen Erlenmeyer filtriert. Man wäscht fünf- bis sechsmal mit je 1 cm³ kochenden Wassers Kölbchen und Filter nach. Wachs, harzige Bestandteile und ein großer Teil der Farbstoffe lassen sich so abscheiden. Ganz farblos ist das Filtrat nicht, und zur weiteren Reinigung versetzt man die nach Abkühlen und nach Zusatz eines kleinen Stückchens blauen Lackmuspapiers mit 1% iger Essigsäure neutralisierte oder sehr schwach sauer gemachte Wasserlösung mit 1—2 cm³ 1% iger Kaliumpermanganatlösung. Man läßt 10 Minuten kalt einwirken, scheidet mit 3% igem, mineralsäurefreiem Wasserstoffsuperoxyd, das 1% Essigsäure enthält, das überschüssige Kaliumpermanganat als Braunstein unter leichtem Erwärmen auf dem Wasserbad ab, filtriert die vollständig farblose Lösung in einen Scheidetrichter von 25 cm³ Inhalt und wäscht mit wenig heißem Wasser Kölbchen und Filter nach. Die Lösung wird dreimal mit dem gleichen Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Man filtriert die Ausschüttelungen durch ein mit Chloroform benetztes Filterchen in einen kleinen Erlenmeyerkolben. An der Außenseite des Abflußrohres des Scheidetrichters auftretendes Coffein wird sorgfältig mitgenommen. Man wäscht das Filter mit Chloroform aus und destilliert das Lösungsmittel ab. Der Rückstand muß ausgebreitet rein weiß und beim Lösen in 1—2 cm³ Chloroform höchstens minimal gefärbt erscheinen. Der Rückstand kann noch nicht der Sublimation unterworfen werden. Es hat sich gezeigt (vergl. Seite 64), daß aus sauren Lösungsmitteln mit Chloroform ausgeschütteltes Coffein zum Teil in Form von Salzen vorhanden ist, die dann unter teilweiser Spaltung sublimieren und zu hohe Resultate bedingen. Das Coffein wird mit Chloroform quantitativ in ein kleines, tiefes Glasschälchen übergeführt, das Lösungsmittel abgedunstet, der Rückstand mit 1—2 cm³ H₂O aufgenommen und unter Zusatz von ein bis zwei Tropfen 2% iger Kaliumkarbonatlösung auf dem Wasserbad zur Trockene verdunstet. Man spült mit Chloroform in kleinen Fraktionen in das Bechergen des Sublimationsapparates

unter Benutzung der nachstehend abgebildeten kleinen Einrichtung zum Abdestillieren resp. Abblasen des Lösungsmittels.

Filtrieren und Abdestillieren, resp. Abblasen darf natürlich nicht gleichzeitig vorgenommen werden. Der Mikrobrenner befindet sich in geeigneter Distanz, und man entfernt ihn vor völliger Verdunstung des Chloroforms, um ein Zerspritzen, das auch bei nicht sorgfältiger Regulierung von Wasserstrahlpumpe und Quetschhahn eintreten kann, zu vermeiden. Bei Beobachtung der nötigen Vorsicht geht innerhalb kürzester Frist der ganze Vorgang glatt vonstatten. Das Becherrchen wird durch Spreizen-

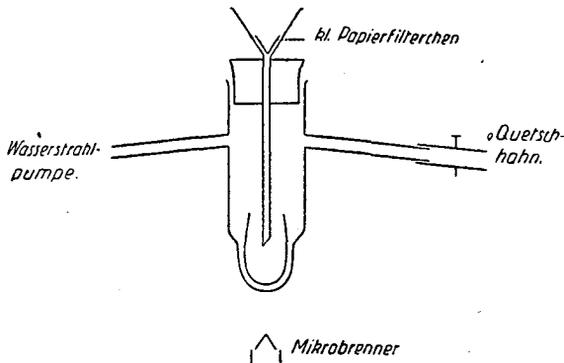


Fig. 3. Einrichtung zum Abdestillieren resp. Abblasen des Lösungsmittels.

lassen einer federnden Pinzette an den inneren Kanten gefaßt, um die Graphitdichtung nicht zu beschädigen. Die an der Außenseite des Erlenmeyerkölbchens und Glasschälchens und am unteren Teil des Einfülltrichterchens auftretenden Coffeinspuren werden auch hier wieder restlos mitgenommen. An den Wänden herauf kriechende Substanz spült man am besten mit wenig Lösungsmittel auf den Grund zurück. Das rein weiße oder höchstens schwach gefärbte, aber trockene und nicht schwierig aussehende Coffein wird ca. $\frac{1}{4}$ Stunde im Vakuum getrocknet (Ersetzen des Trichterchens durch einen nicht durchbohrten Stopfen) und dann bei $160-170^{\circ}$ bei $10-12$ mm Druck in beschriebener Weise sublimiert.

Resultate.

	Makro- bestimmung %	Mikrobestimmungen		
		Angangs- material mg	Gewogenes Coffein mg	%
Handelstee I . . .	3,23	150,4	3,75	3,14
	3,20	133,3	4,26	3,19
	3,21	125,4	4,00	3,19
	3,21	118,0	3,80	3,22
		125,7	3,97	3,16
			3,18	

$D = 0,08\% = 2,5\%$ des Alkaloidgehalts,
 $D_{th} = 0,03\%$ für $E = 120$ mg,
 $\Delta E = 0,2$ mg,
 $P = 3\%$,
 $\Delta m = 0,012$ mg.

Handelstee II. . .	2,98	150,0	4,55	3,03
	—	149,0	4,44	2,98

$D = 0,05\% = 1,6\%$ des Alkaloidgehalts,
 $D_{th} = 0,02\%$.

Handelstee III . .	3,19	94,1	2,98	3,16
	3,18	130,0	3,91	3,01
	3,18	107,6	3,40	3,16
			3,11	

$D = 0,15\% = 5\%$ des Alkaloidgehalts,
 $D_{th} = 0,04\%$ für $E = 94$ mg.

Handelstee IV . .	—	101,0	3,34	3,31
	—	96,2	3,22	3,35
	—	91,4	3,04	3,33
	—	102,9	3,44	3,37
			3,34	

$D = 0,06\% = 1,8\%$ des Alkaloidgehalts,
 $D_{th} = 0,04\%$.

Mikrokjeldahlbestimmung des Coffeins in Tee ^{59, pag. 704}.

	Ausgangs- material	N·3,464		Resultate der gravi- metrischen Mikro- bestimmung ‰
	mg	mg	‰	
Handelstee IV	103,4	3,39	3,31	3,31
	107,0	3,36	3,36	3,35
	114,2	3,80	3,32	3,33
			3,33	3,37
				3,34

$D = 0,05 \text{ ‰} = 1,5 \text{ ‰}$ des Alkaloidgehalts.

Es wurde das durch Ausschütteln mit Chloroform aus der gereinigten Wasserlösung isolierte Coffein nach Kjeldahl verbrannt

Zu diesen Ergebnissen ist folgendes zu bemerken: Die Makrobestimmungen sind in der folgenden Weise ausgeführt worden: bei Nr. I mit je 10 g Ausgangsmaterial nach der Büttenberg-Katzschen Methode, bei der ersten Bestimmung unter Anwendung der Perforation, bei den beiden anderen durch Ausschütteln; bei Nr. II mit 20 g Droge und 10 g 10‰igem Ammoniak durch Ausziehen mit Tetrachlorkohlenstoff im Soxhlet nach Lendrich-Nottbohm und bei Nr. III mit 5 g Droge und 10 g 10‰igem Ammoniak nach Fendler-Stüber-Lendrich-Nottbohm.

Die theoretischen Streuungen der Makroanalysen machen sich in der zweiten Dezimalstelle nicht geltend. Diejenigen der Mikroanalysen sind überschritten worden. Bei der zweiten Analyse im dritten Muster ist Coffein verloren gegangen. Zum Teil mag die etwas große Streuung auf anfangs mangelnde Erfahrung zurückzuführen sein.

Kaffee.

Über den Stand der Chemie des Kaffees berichtet mit den nötigen Literaturangaben Tschirch im dritten Band seines Handbuches der Pharmakognosie.

Bei den Mikrocoffeinbestimmungen im Kaffee ist in gleicher Weise vorgegangen worden wie bei Tee. Zuerst habe ich Bestimmungen mit geröstetem Kaffee ausgeführt, weil Fehler einer Sublimationsmethode bei diesem Objekt am evidentesten in Erscheinung treten, indem die beim Rösten entstehenden Aroma-, Teer- und Farbstoffe am leichtesten mitsublimieren. Richtiges Rösten soll bei einer Temperatur von 160—200° vorgenommen werden, also bei Temperaturen, bei denen Coffein zum Teil schon sublimiert. Zu den Versuchen ist ein gewöhnlicher, fein pulverisierter, gerösteter Handelskaffee verwendet worden.

Coffein nach Lendrich-Nottbohm %	Mikrobestimmungen		
	Ausgangsmaterial mg	Gewogenes Coffein	
		mg	%
1,24	228,8	2,61	1,14
1,21	284,0	3,24	1,14
1,21	241,1	2,94	1,22
1,22	253,6	3,03	1,20
	266,2	3,19	1,20
			1,18

$$D = 0,08\% = 6,5\% \text{ des Alkaloidgehaltes,}$$

$$D_{th} = 0,01\% \text{ bei } E = 250 \text{ mg,}$$

$$\Delta_E = 0,2 \text{ mg,}$$

$$\Delta_m = 0,012 \text{ mg,}$$

$$P = 1,2\%.$$

Die wirkliche Streuung ist eine erheblich größere als die theoretische, ich bin mir aber bei den beiden zu niedrig ausgefallenen Analysen kleiner Fehler (die bei diesen Arbeiten leicht vorkommen) bewußt gewesen. Das erhaltene Coffein ist rein weiß.

Es ist zuerst versucht worden, eine Kaliumpermanganatreinigung zu umgehen, doch läßt sich dies nicht durchführen, wie die Resultate der folgenden kleinen Tabelle und das Aussehen des Coffeins zeigen.

Ausgangsmaterial mg	Gewogenes Coffein		
	mg	%	
313	4,60	1,47	wäßrige Magnesialösung ausgeschüttelt und direkt sublimiert.
282	4,06	1,44	
330	4,38	1,33	Chloroformlösungen mit 2 cm ³ 1%igem KOH geschüttelt und sublimiert.
387	5,35	1,38	
378	4,62	1,22	KMnO ₄ -Reinigung, Ausschütteln der essigsäuren Lösung und direktes Sublimieren. Coffein rein weiß.
270	3,71	1,37	
303	3,91	1,29	
284	3,52	1,24	
190	2,54	1,34	

Es zeigt sich, daß die zum Abscheiden des Kaliumpermanganates notwendige Essigsäure des Wasserstoffsuperoxydes zum Teil mit ins Chloroform übergeht und mit dem Coffein mitsublimiert. Nach Zwischenschalten einer Neutralisation mit Kaliumkarbonat erhält man die richtigen Werte.

Bei Rohkaffee hätte man erwarten können, daß eine weniger intensive Reinigung genügen würde, doch hat es sich nicht als zweckmäßig erwiesen, Vereinfachungen vorzunehmen, indem immer wieder, wenn solche vorgenommen worden sind, die Resultate zu wünschen übrig ließen. Die natürlichen Farbstoffe kommen überall mit und bilden zuletzt ein firnisartiges Sublimationsgut, das trotz Sublimation zu unreinem Coffein führt.

Zur Analyse gelangte ein gewöhnlicher Guatemala Handelskaffee, der zur Herstellung eines feinen Pulvers zuerst teilweise getrocknet werden mußte (Wasserverlust = 5%).

Die maximale Streuung beträgt 0,1% und übersteigt die theoretische bei E = 100 mg zu 0,03% errechnete. Die Mittelwerte sind übereinstimmend. Es ist aber zu bemerken, daß die eine Grundbedingung genauer Analysenresultate bei Alkaloidbestimmungen — Arbeiten in immer gleichen Verhältnissen —

Makrobestimmung nach Lendrich- Nottbohm %	Mikrobestimmungen		
	Ausgangs- material mg	Gewogenes Coffein	
		mg	%
1,41	365,2	5,37	1,47
1,44	352,0	5,01	1,42
1,44	290,1	4,21	1,45
1,43	275,2	3,95	1,44
	255,0	3,60	1,42
	201,8	2,77	1,37
	183,1	2,65	1,45
	168,2	2,37	1,41
	126,0	1,79	1,42
	105,0	1,47	1,40

$D = 0,1\% = 7\%$ des wirklichen Alkaloidgehaltes,
 $D_{th} = 0,03\%$.

durch die Variation der Ausgangsmengen von 105—360 mg nie inne gehalten wurde. Das erhaltene Coffein ist rein weiß.

Auf diese Weise ist es möglich, den Coffeingehalt einer einzigen Kaffeebohne zu bestimmen. Die Gewichte gerösteter Kaffeebohnen schwanken zwischen 0,1 und 0,2 g, die der rohen zwischen 0,1 und 0,3 g.

Mate.

Über die Chemie des Mate ist das wenige, was bekannt ist, im Tschirchschen Handbuch zusammengestellt.

Die Makrocoffeinbestimmungen sind nach dem Verfahren von Lendrich-Nottbohm ausgeführt, das eine Mal mit 10 g Droge und 10 cm³ 10%igem Ammoniak, das andere Mal mit 20 g Droge und 10 cm³ 10%igem Ammoniak. Die nach dem Aufnehmen des Destillationsrückstandes des Tetrachlorkohlenstoffauszuges erhaltene Wasserlösung ist infolge des reichlichen Wachsgehaltes schwer filtrierbar, und man bedient sich am besten der Saugpumpe und der Nutsche.

Die Mikrobestimmungen wurden nach der bei Tee beschriebenen Methode durchgeführt. Zu den Analysen benutzte ich ein Pulvis subtilis der Droge.

Makrobestimmung %	Mikrobestimmungen		
	Ausgangsmaterial mg	Gewogenes Coffein + Theobromin *)	
		mg	%
0,76	231,0	1,84	0,80
0,80	279,0	2,13	0,76
0,78	300,0	2,41	0,80
			0,78

$$D = 0,04 \% = 5 \% \text{ des Alkaloidgehaltes,}$$

$$D_{th} = 0,01 \% \text{ bei } E = 250 \text{ mg.}$$

Die theoretische Streuung ist ebenfalls überschritten worden.

Versehentlich ist einmal die Kaliumpermanganatreinigung in warmer Lösung erfolgt, und es konnten noch 0,45 mg bei einem Ausgangsmaterial von 208 mg erhalten werden, d. h. Dreiviertel des Coffeins sind oxydiert worden.

Beim Überführen des Coffeins in das Sublimationsbecherchen fiel ein in Chloroform schwer löslicher Körper auf, der sich auch als schwieriger sublimierbar erwies. Die Sublimationstemperatur mußte allmählich auf 190—200° gesteigert werden, um minimale Mengen dieses Körpers innerhalb der kurzen Zeit, wie sie für reines Coffein genügen, mit zu erhalten. Das Sublimat wies unterhalb des Coffeins einen minimalen, weißen, kompakten Rand auf, der dem Auge eben als scharf abgegrenzter Ring wahrnehmbar war. Die Vermutung, daß in Mate außer Coffein auch Theobromin vorhanden sei, erwies sich als richtig.

Aus 40 g Mate wurden nach Lendrich-Nottbohm die Alkaloide isoliert. Das Coffein wurde durch heißen Tetrachlorkohlenstoff entfernt. Die verbleibende Base, einige Milligramm,

*) Vergleiche die nachfolgenden Darlegungen.

wurde z. T. im Apparätchen sublimiert oder ohne vorherige Sublimation geprüft und mit reinem Theobromin verglichen. Sie wies folgende Eigenschaften auf:

	Reines Theobromin	Isolierte Base
Schmelzpunkt	328°	323°*)
Murexidreaktion	positiv	positiv
Löslichkeit in Chloroform	schwer	schwer
Sublimationsfähigkeit . .	vide Vorversuche (pag. 53)	geringere Steighöhe als Coffein, das noch in einigen wenigen Kriställ- chen mitging.
Formen der Mikrosublimat	identisch: kurze Nadeln, z. T. pulverig.	
Mikroreaktion mit 5%igem $K_2Cr_2O_7$ in H_2SO_4 ⁸⁸ . .	gleiche Übergänge der Farbnuancen: purpurschwarz — purpurgrün — olivgrün — hellblau — grün.	
Reaktion mit Wismut- Kaliumjodid ⁶⁰	Niederschlag: hellbraun — dunkel- braun.	
Mikroreaktion mit konz. Chloralhydratlösung ⁸⁸ .	identisch	
Mikroreaktion mit Jod- wasserstoffsäure ⁸⁸ . . .	identisch	
Mikroreaktion mit Silber- nitrat ⁸⁸	identisch	
Mikroreaktion mit konz. Salpetersäure ⁸⁸	identisch	

Es darf also angenommen werden, daß Theobromin als Begleiter des Coffeins in Mate auftritt, wodurch die von verschiedenen Autoren hervorgehobene verstärkte diuretische Wirkung

*) Es wurde die nicht sublimierte Base verwendet.

des Matetees im Vergleich zum Schwarztee eine Erklärung findet. Quantitativ ist Theobromin in geringer Menge vorhanden, macht sich aber bei einem Gehalt von 0,8% an Alkaloiden schon geltend. Die obigen Mikroanalysen sind theoretisch insofern nicht ganz genau, als durch Kaliumkarbonat Theobromin teilweise zurückgehalten wird, wie bei den Kakao-Theobrominbestimmungen näher zu erörtern sein wird. Praktisch fallen zwar die Resultate der Makro- und Mikroanalysen zusammen, wobei zu bemerken ist, daß bei den Makroanalysen der genannte Fehler nicht in Betracht kommt.

Zur quantitativen Bestimmung des Theobromins wurden 30 g Droge mit 30 g siedenden Wassers durchfeuchtet und über Nacht stehen gelassen, im Soxhlet mit Alkohol vollständig ausgezogen; die alkoholische Lösung wurde mit einer Anreicherung von 10 g sodafreier Magnesia usta ponderosa nach Power-Chesnut¹⁹ bis fast zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde mit heißem Wasser aufgenommen, auf der Nutsche filtriert und gut mit viel Wasser heiß nachgewaschen. Die wäßrige Lösung wurde auf dem Wasserbad konzentriert, mit verdünnter Essigsäure neutralisiert und nach Zufügen einiger Tropfen farblosen Phenols im Katzschen Perforator mit Chloroform erschöpfend extrahiert. Nach Abdestillieren und Abblasen des Lösungsmittels hinterblieben die Alkaloide noch in einem schmierigen Zustande. Sie wurden in ca. 250 cm³ heißem Wasser gelöst; die Lösung wurde heiß filtriert und dann kalt während einer halben Stunde mit 50 cm³ einer 1%igen Kaliumpermanganatlösung behandelt. Nach Abscheiden des überschüssigen Kaliumpermanganates mit essigsäurem Wasserstoffsperoxyd und Filtration dampfte ich die Lösung vollständig ein, trocknete im Trockenschrank während 10 Minuten bei 80° und entzog mit heißem, trockenem Chloroform dem braunen Rückstand die Basen. Zur Trennung wurde die verschiedene Löslichkeit von Theobromin und Coffein in Benzol benutzt. Nach Göckel³² lösen 100 g Benzol bei 18° 0,911 g, bei Siedetemperatur 5,29 g Coffein, während für Theobromin Wadsworth⁹⁴ angibt, daß 100 cm³ Benzol bei 15,5° 0,005 g lösen. Es erfolgte eine entsprechende Korrektur.

Gesamtbasen: 0,76 ‰; Theobromin: 0,07 ‰;
 0,61 ‰; 0,09 ‰.

Die Mengen der beiden Basen Theobromin und Coffein stehen in einem Verhältnis von ca. 1:10 zueinander.

Bei der zweiten Makroanalyse wurde analog dem Verfahren bei Kakao zuerst mit 3 ‰iger Schwefelsäure aufgespalten und dann kochend mit Magnesia usta, die 0,4 ‰ Soda enthielt, weiter behandelt. Die Wasserlösung wurde nach dem Eindampfen perforiert; die Alkaloide wurden, wie oben angegeben, weiter gereinigt. Der Verlust an Coffein beruht auf der Verwendung von sodähaltiger Magnesia.

Kola.

Über die Chemie und quantitative Zusammensetzung der Kola-Samen finden sich Angaben im Tschirchschen Handbuche zusammengestellt. Neben vorwiegend Coffein ist wenig Theobromin vorhanden. Nach einer Angabe bei König beträgt der Gehalt 2,09 ‰ Coffein und 0,023 ‰ Theobromin. Ein anderer Autor findet ein Verhältnis von 100 Teilen Coffein zu 1,48 Teilen Theobromin. Praktisch handelt es sich also bei der Alkaloidbestimmung im Samen Colae um Coffeinermittlungen, da der prozentuale Gehalt an Theobromin meistens mit der Fehlergrenze der Analyse zusammenfällt. Zur Bestimmung der Basen werden von der schweizerischen, französischen und holländischen Pharmakopoe Methoden angegeben.

Meine Makroanalysen sind in folgender Weise ausgeführt worden: 10 g der Droge werden mit 200 g Chloroform und 10 cm³ 10 ‰igem Ammoniak $\frac{1}{2}$ Stunde intensiv geschüttelt. Nach halbstündigem Stehen wird ein aliquoter Teil durch ein Sandersches Zigarettenfilter abgossen, eine Spur Paraffin zugesetzt, das Lösungsmittel abdestilliert und mit einigen Kubikzentimetern absolutem Alkohol vollständig entfernt. Man nimmt mit 40 cm³ 0,5 ‰iger Salzsäure heiß auf, filtriert nach Abkühlen und wäscht dreimal mit je 10 cm³ Wasser nach. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad auf 10—15 cm³ eingedampft und warm in einen Katzschen

Perforator filtriert; man wäscht nach und extrahiert drei Stunden lang mit Chloroform. Die befolgte Methodik ist ziemlich dieselbe, wie sie von der U. S. Ph. VIII für Guarana-Wertbestimmung vorgeschrieben wird. Das Eindunsten der sauren Lösung auf dem Wasserbad hat ein teilweises Unlöslichwerden der Farbstoffe zur Folge.

Die Mikroanalysen wurden nach der bei Tee beschriebenen Methodik mit einem feinen Handelskolapulver durchgeführt.

	Makro- analyse %	Mikroanalysen		
		Ausgangs- material mg	Gewogenes Coffein mg	%
Semen colae	1,40	187,8	2,74	1,46
pulvis	1,41	179,4	2,50	1,39
	1,42	173,8	2,42	1,38
	1,41	214,8	2,94	1,37
	1,45	138,9	1,89	1,36
	1,46	159,0	2,24	1,41
	—	154,3	2,17	1,40

$D = 0,1\% = 7\%$ des Gesamtalkaloidgehaltes,
 $D_{th} = 0,02\%$ bei einer Einwage = 140 mg.

Die theoretische Streuung ist überschritten worden, hält sich aber mit einer einzigen Ausnahme innerhalb der Grenze von 0,05%. Das erhaltene Coffein ist rein weiß. Die beiden Makroanalysen mit den Resultaten 1,45% und 1,46% lieferten ohne Konzentrieren der schwach sauren Coffein-Wasserlösung bei direkter Perforation ein stärker braun gefärbtes Coffein, als die Analysen: 1,41.

Guarana.

Über die Zusammensetzung der Guarana, der Samenpaste von Paullinia Cupana Kunth, finden sich Angaben im Tschirch-schen Handbuch.

Die Makroanalysen von Guarana wurden in gleicher Weise ausgeführt wie diejenigen von Semen colae. Zur ersten Bestimmung verwendete ich Guarana und Extraktionsmittel in denjenigen Mengenverhältnissen, wie sie die Pharmacopoea Helvetica IV vorschreibt (7 g Droge, 70 g Chloroform, 5 cm³ Ammoniak), zu den beiden anderen in den von der U. S. Ph. VIII vorgeschriebenen (6 g Droge, 200 g Chloroform, 5 cm³ Ammoniak). Die in der schweizerischen Pharmacopoe vorgeschriebene, nach dem Abdestillieren des Chloroforms weiter befolgte Methodik ist nicht brauchbar, indem durch Aufnehmen des Destillationsrückstandes im Wasser keine klare Lösung erhalten wird. Das erhaltene Coffein sieht sehr unrein aus. Bei dem hohen Coffeingehalt der Guarana beeinflussen allerdings relativ große Verunreinigungen das prozentuale Resultat nicht in dem Maße wie bei Drogen mit kleinem Alkaloidgehalt.

Mikrochemisch ergaben sich einige Schwierigkeiten, indem das Glukosid Guarantin in (Zucker-Gerbstoff-Coffeinverbindung) ein relativ beständiger Körper ist und die einfache Abspaltung des Gerbstoffes durch Einwirken von Ammoniak in der Kälte oder durch kurzes Aufkochen mit Magnesia usta nicht gelingt. Man verwendet zu diesem Zwecke mit Vorteil heiße, verdünnte Schwefelsäure (1—4%).

Es wurde mit einem im Soxhlet bereiteten alkoholischen Auszug von pulverisierter Guarana (10 g Droge entsprechend 800 g des Alkoholauszuges) gearbeitet, da zu Anfang schlecht übereinstimmende Resultate mit der Droge bei dem hohen Coffeingehalt auf ungleichmäßige Probeentnahme zurückgeführt wurden. Es kamen jeweils 10 g der obigen Tinktur zur Verwendung. Der Destillationsrückstand wird unter Zusatz von etwas Äther und Abdampfen vollständig getrocknet, in 5 cm³ 1% iger Schwefelsäure aufgenommen und 10—15 Minuten in leichtem Sieden erhalten. Durch weiteres, halbstündiges Digerieren mit der im Verhältnis zur Säure vierfachen Menge sodafreier Magnesia usta auf dem siedenden Wasserbade erhält man eine kaum noch gefärbte Wasserlösung. Ein längeres Kochen mit Magnesia ist nicht zulässig, weil dadurch so geringe Mengen Coffein, wie sie zur Bestimmung

gelangen, zerstört werden. Der weitere Gang der Analyse erfolgt in der bei Tee beschriebenen Weise (vergl. Seite 59). Die nach dem Neutralisieren mit 1% iger Essigsäure vorzunehmende Kaliumpermanganatreinigung erübrigt sich trotz vorangegangener Behandlung mit Schwefelsäure und Magnesia usta gleichwohl nicht.

Das mit Chloroform ausgeschüttelte Coffein zeigte beim Aufnehmen in Wasser Spuren einer auf dem Wasser sich ansammelnden Verunreinigung, die in Kaliumkarbonat löslich ist. Man nimmt am besten nach völligem Abdestillieren des Chloroforms schon im Kölbchen mit wenig Wasser auf, filtriert unter Nachwaschen durch ein kleines Filterchen in ein Schälchen und dunstet unter Zusatz von 1—2 Tropfen einer 1% igen Kaliumkarbonatlösung auf dem Wasserbade zur Trockne ein. Die Base kann jetzt sublimiert werden.

Makroanalysen %	Mikroanalyse		
	Ausgangsmaterial	Gewogenes Coffein	
		mg	%
4,70	10 g einer Tinktur	5,86	4,69
4,71	aus 10 g Droge	5,86	4,69
4,73	ad 800 g Alkohol-	5,84	4,67
	auszug	5,85	4,68
4,71	= 0,1250 g Droge	5,87	4,69
			4,68

$$D = 0,02\% = 0,7\% \text{ der absoluten Alkaloidmenge,}$$

$$D_{th} = 0,06\%.$$

Nach Benedetti-Pichler⁷ ergibt sich beim Unterteilen eines zu analysierenden Körpers in einem Flüssigkeitsquantum N, wovon n Teile Lösung analysiert werden, eine maximale Streuung des Prozentfehlers von

$$D_{th} = 2P \left(\frac{\Delta_E}{E} + \frac{\Delta_N}{N} + \frac{\Delta_n}{n} \right) + 200 \cdot f \cdot \Delta_m \cdot \frac{N}{n \cdot E}.$$

Die erlaubte maximale Streuung errechnet sich in obigem Falle zu 0,06%, während die beobachtete 0,02% beträgt.

Kakao.

Über die Chemie und die Zusammensetzung des Kakao berichten die Handbücher von Tschirch und König ausführlich.

Eine gravimetrische Mikrobestimmungsmethode der Xanthinbasen in Kakao begegnete infolge der Schwerlöslichkeit des Theobromins in den meisten Lösungsmitteln einigen Schwierigkeiten. Viele Versuche führten zu einem, wenn auch nicht in allen Teilen befriedigenden, so doch brauchbaren Resultat.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: In einem ca. 60 cm³ Erlenmeyerkolben wurde auf der analytischen Wage eine bestimmte Menge (0,1—0,5 g) Pulverkakao eines Handelsdurchschnittsmusters abgewogen, mit wenig Alkohol befeuchtet und eine Stunde mit einer Mischung von 5 cm³ 10%iger Schwefelsäure und 10 cm³ Wasser unter Anwendung einer Steigröhre in leichtem Sieden erhalten. Dann wurden ca. 20 cm³ Wasser und 0,5 g sodafreie Magnesia usta zugegeben; hierauf kochte man kurz auf, setzte gleich etwas Wasser zu, ließ abkühlen und brachte das Ganze auf einer Rezepturwage durch weiteren Zusatz von Wasser auf ein bestimmtes Gewicht. Ein aliquoter, auf einer Rezepturwage gewogener Teil der filtrierten Lösung wurde in einer Schale auf dem Wasserbad vollständig zur Trockne gebracht, in 10 cm³ heißem Wasser aufgenommen und unter Zusatz eines kleinen Stückchens blauen Lackmuspapieres mit 1%iger Essigsäure neutralisiert oder minimal sauer gemacht. Die erkaltete Lösung wurde mit 3—5 cm³ 1%iger Kaliumpermanganatlösung zirka eine Stunde lang stehen gelassen, mit essigsauerm Wasserstoffsperoxyd vom überflüssigen KMnO₄ befreit, filtriert und das Filter nachgewaschen. Das vollständig klare, farblose oder minimal gefärbte Filtrat wurde auf 3—4 cm³ eingedampft; diese wurden quantitativ in einem zweckmäßig gestalteten Perforator über Chloroform geschichtet. Dem Waschwasser wurden 5—8 Tropfen farblosen Phenols zugegeben. Man perforierte sechs Stunden mit ca. 50 cm³ Chloroform, das sich in einem entsprechenden Weithalskölbchen befand, in der Weise, daß 2 bis 3 Tropfen Chloroform unterwegs waren. Das Chloroform wurde abdestilliert und das Phenol durch Über-

leiten von Luft an der Wasserstrahlpumpe abgeblasen. Man nahm die farblosen oder minimal gefärbten Basen in 2 cm³ Wasser + 0,5 cm³ gesättigter Magnesiumhydroxydlösung auf, hielt über freiem Feuer geringe Zeit im Sieden und filtrierte durch ein kleines Filterchen in ein kleines Glasschälchen von ca. 20 cm³ Inhalt. Kolben und Filter wurden fünf- bis sechsmal mit je 1—1½ cm³ Wasser heiß nachgewaschen. Die Lösung wurde zur

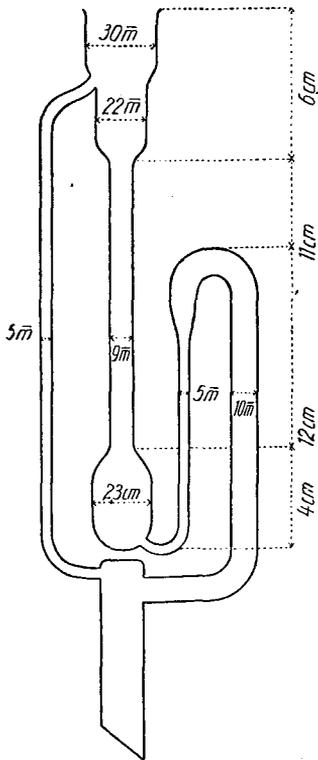


Fig. 4. Perforator.

Trockene verdunstet und die Basen wurden mit warmem 2%igen Phenolchloroform in das Sublimationsbecherchen gebracht. Um alles Theobromin mitzuerhalten, mußte ziemlich oft nachgewaschen werden. Man blies das Chloroform ab und entfernte am Ende des Prozesses das Phenol in der Weise, daß man die Abdampfvorrichtung (vergl. Seite 60) über ein siedendes Wasserbad brachte, um allmählich immer energischer Luft überzuleiten. Um letzte Teile Phenol zu entfernen wurde es notwendig, dem Rückstand einige Tropfen Chloroform und Alkohol (zirka je 0,5 cm³) sowie 3—4 Tropfen Wasser zuzugeben und erneut abzublasen. Nach 10—15 Minuten Trocknen im Vakuum wurde bei 200—210° sublimiert.

Der erwähnte Perforator weist nebenstehende Konstruktion (Fig. 4) auf und erlaubt ein Erschöpfen von ca. 10 cm³ einer Wasserlösung.

Die Analysenresultate sind folgende:

Makrochemisch: Nach Prochnow⁷¹ 2,77%,
2,75%.

Mikrochemisch:

Abgewogene Kakaomenge	Zur Bestimmung verwendeter Teil der wässerigen Lösung	Zur Bestimmung gelangender Teil des Kakaopulvers	Gewogene Basen	
			g	mg
0,2688	$\frac{18,0}{55,1}$	0,0878	2,20	2,57
0,4100	$\frac{25,0}{62,1}$	0,1651	4,46	2,58
0,1523	$\frac{20,0}{56,8}$	0,0532	1,41	2,65
0,1524	$\frac{20,0}{62,1}$	0,0491	1,28	2,61
0,3368	$\frac{20,0}{62,1}$	0,1085	2,76	2,54
0,1777	$\frac{20,0}{60,1}$	0,0591	1,52	2,57
0,1777	$\frac{15,0}{60,1}$	0,0470	1,19	2,53

$$D = 0,13\% = 5\% \text{ des Alkaloidgehaltes,}$$

$$D_{th} = 0,05\%.$$

Die Zahlen der zweiten Kolonne ergeben sich so, daß z. B. ein Kölbchen von 17,3670 g mit 0,2688 g Kakao nach dem Aufschließen und Versetzen mit 0,5 g Magnesia usta auf ein Totalgewicht von 80 g gebracht und von diesem das Gewicht des Kölbchens und der Magnesia abgezogen wird. Die kleinere Zahl entspricht dem verwendeten aliquoten Teil.

Die Streuung des prozentischen Fehlers errechnet sich theoretisch, wie bei Guarana angegeben, zu 0,05%, und beträgt praktisch in obiger Analysen-Serie 0,13. Die etwas größeren Abweichungen können ihre Ursachen in der schweren Löslichkeit des Theobromins und der höheren Sublimationstemperatur haben, sowie im konstanten Mitgehen von Spuren eines alkalilöslichen, fett-

artigen Körpers, der wie bei Guarana im Analysengang durch eine erneute Filtration zurückgehalten wird. Das erhaltene Sublimat ist rein weiß oder minimal gelblich und läßt ohne weiteres oben die geringen Mengen Coffein in relativ großen Kristallen von dem unteren, kompakt aussehenden Theobromin unterscheiden.

Die Makroanalysen nach der Methode von Prochnow⁷¹ liefern ein bräunliches Basengemenge, das zwar aschenfrei, aber doch erheblich unrein ist. Die Perforation der alkalischen Basen-Wasserlösung mußte entgegen der Angabe von vier Stunden auf zehn ausgedehnt werden.

Die Resultate der Makrobestimmungen sind durchwegs höher als diejenigen der Mikromethode.

III. Zusammenfassende Bemerkungen zu den vorstehenden Mikrobestimmungsmethoden.

Vergleicht man im allgemeinen die erhaltenen Mikrowerte mit den Makroresultaten, so ist zu sagen, daß bei ersteren die Streuungen etwas größer sind als bei den letzteren. Dies mag z. T. in dem Umstande begründet sein, daß das Arbeiten mit minimalen Substanzmengen leichter zu merklichen Verlusten führt, z. T. aber auch darin, daß entgegen den bei den Makromethoden geltenden, festen Gewichtsverhältnissen zwischen Droge und verwendeten Reagentien diese bei den mikrochemischen Bestimmungen variiert wurden. Doch ist zu konstatieren, daß die Resultate der Mikrobestimmungen noch ziemlich gut übereinstimmen, selbst wenn die verwendete Ausgangsmenge um das 4—5fache variierte. Arbeitet man bei Doppelanalysen genau gleich, so läßt sich die Differenz bei absolut fehlerfreiem Arbeiten leicht innerhalb 0,05% halten, z. T. werden sogar ganz übereinstimmende Resultate erhalten. — Weiter wäre zu sagen, daß die auch anderwärts festgestellte Tatsache zu Recht besteht: Wenn verschiedene nach einer Mikromethode ausgeführte Analysen übereinstimmende

Vergleichende Zusammenstellung der ermittelten
Mengen und ihrer Fehler.

	Ermittelte Menge mg	Fehler ‰	
Spektrographische Methode nach V. Henri ⁶⁶ . .	0,1—0,2	ca.10	
Biologische Methode nach Friedberg ⁶⁷ .	0,07—10	ca.10	Zur Bestimmung gelangt sogen. „Aktivpurin“.
Gravimetrische Mikromethode: reines Coffein	0,64—2	1,4	Größte Differenz unter 5 Bestimmungen
reines Theobromin .	1,01—3	4,8	Unter 6 Bestimmungen 5 innerhalb 1,8 ‰, eine zu 4,8 ‰
Coffein aus Tee . . .	3—5	5	In Serie von 5 Bestg. 2,5 ‰ " " " 2 " 1,6 ‰ " " " 3 " 5,0 ‰ " " " 4 " 1,8 ‰
Coffein aus geröstetem Kaffee	2,6—3,5	6,5	Serie von 5 Bestimmungen
rohem Kaffee . .	1,0—4	7	Unter 10 Bestimmungen 8 innerhalb 3,5 ‰, 2 innerhalb 7 ‰
Coffein-Theobromin in Mate	1,8—2,5	5	3 Bestimmungen
Coffein in Kola . . .	1,9—3	7	Von 7 Bestimmungen 6 innerhalb 3,5 ‰, eine zu 7 ‰
Coffein in Guarana	5,8	0,7	5 Bestimmungen
Theobromin-Coffein in Kakao	1,1—4,5	5	7 Bestimmungen.

Resultate liefern, so sind die gewogenen Substanzen im allgemeinen als rein anzusehen. Bei nicht genügender Reinigung machen sich Differenzen mikrochemisch weit mehr geltend als makrochemisch.

Was die Dauer einer Analyse betrifft, so konnte eine solche in $3\frac{1}{2}$ bis 4 Stunden zu Ende geführt werden, exkl. Kakao. Eine Doppelbestimmung könnte in ca. 5 Stunden durchgeführt werden, da das Sublimationsapparätchen zur Aufnahme der Coffeinemengen der zweiten Bestimmung bereit ist.

Bei mikrochemischen Serienbestimmungen von Coffein, resp. Coffein-Theobromin dürfte in vielen Fällen die Mikro-Kjeldahl-Methode vorteilhaft Verwendung finden. Sie gestattet als Titrationsmethode unzweifelhaft ein rascheres und bequemerer Arbeiten als die gravimetrische Mikromethode. Voraussetzung ist natürlich, daß die alkaloidhaltigen Drogen- resp. Pflanzenauszüge vor der Verbrennung soweit gereinigt werden, daß keine störenden N-haltigen Stoffe zugegen sind. Die gravimetrische Methode erlaubt die Bestimmung des Coffeins in der einzelnen Kaffeebohne, im einzelnen Kakao-, Guarana- und Kolasamen und im einzelnen größeren Mateblatt. Zur Bestimmung der Alkaloide in einzelnen kleinen Blättern (Tee, Mate) müßten spezielle Untersuchungen gemacht werden.

Zieht man, soweit dies erlaubt ist, zum Vergleiche der ausgearbeiteten, gravimetrischen Mikrosublimationsmethode die spektrographische und biologische Ermittlung heran, die ebenfalls kleine Menge bestimmen, so ergibt sich vorstehende Zusammenstellung.

Aus dieser Tabelle ergibt sich, daß ein Vergleich der drei Methoden wohl zulässig ist. Der Fehler ist bei der gravimetrischen Mikromethode um die Hälfte kleiner als bei den anderen, freilich gelangen etwas größere Mengen zur Bestimmung. Die Angabe der biologischen Methode von 0,07 mg hat mehr theoretischen Wert, in praxi hat der Autor mit Mengen bis zu ca. 0,5 mg gearbeitet. Diese Grenze ist durch die Kuhlmannsche Mikrowage ebenfalls noch erreichbar (vide Mate-Fehlanalyse, pag. 66, und Coffeinsublimation, pag. 53).

Zusammenfassung.

Es wurde eine Zusammenstellung der bisherigen allgemeinen und speziellen Coffein- resp. Coffein-Theobrominbestimmungsmethoden in besonderer Berücksichtigung der Purindrogen gegeben.

Es wurden die zur quantitativen Mikrosublimation bei vermindertem Druck geeigneten Verhältnisse für Coffein und Theobromin studiert und geeignete Apparätchen angegeben.

Es wurde eine mikrochemische, gravimetrische Sublimationsmethode zur Bestimmung von Coffein und Theobromin-Coffein in Tee, Mate, rohem und gebranntem Kaffee, Kola, Guarana und Kakao ausgearbeitet; die erhaltenen mikrochemischen Resultate wurden durch makrochemische Bestimmungen kontrolliert. Die Methode benutzt als letzte Reinigungsoperation für die Alkaloide die Vakuumsublimation und gestattet die Bestimmung der genannten Purinbasen in einer einzelnen Kaffeebohne, einem einzelnen Kola-, Kakao- oder Guarana-Samen, sowie im größeren, einzelnen Mateblatt.

In Mate wurde die Anwesenheit von Theobromin zum ersten Male festgestellt.

Literatur.

1. Americ. Assay of Agricult. Chemists, Americ. pharm. journ., p. 560 (1921); Ref. pharm. Ztg. **67**, 1104 (1922).
2. Azadian, Bl. soc. chim. belg. **31**, 15 (1922).
3. Balland, Journ. pharm. et chim. [6] **20**, 543 (1904).
4. Baur, Bedeutung der Solanaceenalkaloide, Dissertation, Bern (1919).
5. Beckurts-Fromme, Z. f. U. d. N. u. G. **12**, 83 (1906); **9**, 377 (1905).
6. Beïtter, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **11**, 339 (1901).
7. Benedetti-Pichler, Fr. **61**, 305 (1922).
8. Bertrand, Bl. d. Sc. pharmacolog. **5**, 283 (1902), **13**, 249 (1910).
9. Burmann, Z. f. U. d. N. u. G. **25**, 75 (1903).
10. Büttenberg, Z. f. U. d. N. u. G. **9**, 110 (1905).
11. Camilla und Pertusi, Giorn. farm. chim. **61**, 337 (1912).
12. Carlinfatti und Scelba, C. II, 39 (1919).
13. Christopher, Ch. Z. **36**, 28 (1912).
14. Costes, Annal. chim. analyt. **17**, 246 (1912).
15. Débourdeaux, Journ. pharm. et chim. **15**, 306 (1917).
16. Dekker, Über Kakaobestandteile und ihre Bestimmung, Dissertation, Bern 1902.
17. Deuß, Pharm. Weekblad **12**, 938 (1916).
18. Diepolder, Ch. Z. **35**, 1 (1911).
19. Dietrich, Pharm. Zentralhalle **36**, 544 (1896); Pharm. Ztg. **42**, 647 (1897).
20. Eder, Mikrosublimation von Alkaloiden im luftverdünnten Raum, Dissertation, Zürich 1912.
21. Emery und Spencer, Journ. Ind. u. Eng. chem. **6**, 665 (1914).
22. v. Fellenberg, Mitteilungen a. d. Schweiz. Gesundheitsamt **9**, 73 (1919).
23. Fendler-Stüber, Z. f. U. d. N. u. G. **28**, 11 (1914).
24. Fischer, Emil, B. **31**, 3266 (1899).
25. Flückiger-Meier, Pharm. Zentralhalle **36**, 544 (1896).
26. Folin, Abderhaldens Handbuch d. biochem. Arbeitsmeth., 1. Aufl., **3**, II, 886.
27. Forster-Riechelmann, Z. f. öff. Chem. **3**, 131 (1897).
28. Friedberg, Bio. Z. **118**, 164 (1921).
29. Fühner, Abderhaldens Handbuch d. biochem. Arbeitsmeth., 1. Aufl., **5**, II, 85.
30. Gadamer, Ar. **257**, 78 (1899).

31. Ganse, Journ. Soc. Chem. et ing. **15**, 95 (1896).
32. Göckel, Journ. chem. Soc. **74**, 327 (1898).
33. Gomberg, Fr. **36**, 259 (1897).
34. Gorter, A. **358**, 327 (1908).
35. Grandval-Lajoux, Journ. pharm. et chim. **168**, 27 (1893).
36. Graves und Kober, Journ. Americ. pharm. Soc. **37**, 2430 (1916).
37. Grimme, Pharm. Zentralhalle **61**, 521 (1920).
38. Hanuš-Chiocenský, Z. f. U. d. N. u. G. **11**, 313 (1906).
39. Hartwich, Z. f. U. d. N. u. G. **18**, 721 (1909).
40. Henri Victor, Etudes de photochimie 1919.
41. Herlant, Documents sur la composition normale des principaux denrées alimentaires, p. 204 (1895).
42. Herzig, Ar. **259**, 249 (1921).
43. Hilger, Mitteilungen aus dem pharm. Institut Erlangen, 1890.
44. Hilger-Juckenack, Forschungsberichte über Lebensmittel **4**, 19 und 151 (1897).
45. Janett, Elektrometrische und konduktometrische Titrationsen, Dissertation, E. T. H. Zürich, 1922, p. 62; Helv. **6**, 734 (1923).
46. Katz, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **12**, 250 (1902).
47. Katz, Ar. **243**, 42 (1904).
48. Katz, Apotheker Ztg. **18**, 683 (1903).
49. Katz, Pharmac. Ztg. **17**, 526 (1909).
50. Keller, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **7**, 105 (1897).
51. Keller-Beitter-Fromme, Geschäftsberichte Caesar & Loretz, p. 43 (1898).
52. Kempf, J. pr. **78**, 201 (1908).
53. Kolthoff, Z. An. Ch. **112**, 187 (1920).
54. Krafft, B. **28**, 2583 (1895).
55. Kreutz, Z. f. U. d. N. u. G. **16**, 579 (1908); **17**, 526 (1909).
56. Léger, Journ. pharm. et chim. (6) **18**, 57 (1903).
57. Lendrich-Murfield, Z. f. U. d. N. u. G. **16**, 647 (1908).
58. Lendrich-Nottbohm, Z. f. U. d. N. u. G. **18**, 300 (1909).
59. Lieb, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth., I. Aufl., **9**, 665 und 704.
60. Malmy, Journ. pharm. et chim. [7] **23**, 89 (1921).
61. Molisch, Mikrochemie der Pflanze, Jena 1913.
62. Murray, Journ. of Ind. et Eng. chem. **5**, 668 (1913).
63. Neßler, Ch. Z. **27**, 270 (1903).
64. Netolitzky, Z. f. U. d. N. u. G. **6**, 982 (1903).
65. du Pasquier, Beiträge zur Kenntnis des Tees, Dissertation, Zürich 1909.
66. Paul und Cownley, Pharm. Journ. u. Transact., p. 417 (1887).
67. Philipp, Mitteilungen a. d. Schweiz. Gesundheitsamt **7**, 37 (1916).
68. Polenske, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte **38**, 150 (1911).
69. Power und Chesnut, Am. Soc. **41**, 1298 (1919).
70. Pregl, Quantitative Mikroanalyse, Berlin.

71. Prochnow, Ar. **247**, 698 (1909).
72. Puckner, Pharmaceut. Review. 9, X, 1905.
73. Reinsch, Z. f. U. d. N. u. G. **15**, 702 (1908).
74. Rieber, B. **33**, 1655 (1900).
75. v. Romburgh, Z. f. U. d. N. u. G. **1**, 211 (1898); **2**, 290 (1899).
76. Rosenthaler, Ap. Ztg. **24**, No. 74 (1909).
77. Rosenthaler, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **30**, 19, 392 (1920); **31**, 396 (1921).
78. Sander, Z. f. U. d. N. u. G. **6**, 903 (1903).
79. Savini, Annal. chim. applicat. **6**, 247 (1916).
80. Schmidt, Abderhaldens Handbuch d. biochem. Arbeitsmeth., II. Aufl., Abt. I, Teil 9, pag. 556.
81. Siedler, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **8**, 19 (1898).
82. Stefan, B. d. k. k. Akad. Wien (2) **68**, 385 (1897).
83. Stroup, C. II, 265 (1920).
84. Tatlock und Thomson, Z. f. U. d. N. u. G. **22**, 530 (1911).
85. Thoms-Jonescu, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **16**, 130 (1906).
86. Trillick-Göckel, Forschungsberichte über Lebensmittel **4**, 78 (1897).
87. Tunmann, Pflanzenmikrochemie, Berlin 1913.
88. Tunmann, Pharm. Zentralhalle **54**, 1065 (1913), **63**, 103 (1919).
89. Ugarte, Journ. pharm. et chim. (7) **24** 387 (1921).
90. Ugarte, Journ. pharm. et chim. (7) **27** 420 (1923).
91. Utz, Ch. Z. **33**, 47 (1909).
92. Vauthier, Mitteilungen a. d. Schweiz. Gesundheitsamt **9**, 54 (1918); **10**, 275 (1919).
93. Virchow, Ch. Z. **34**, 1037 (1910).
94. Wadsworth, Analyst **45**, 133 (1920); **46**, 32 (1921).
95. Waentig, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte **33**, 334 (1906).
96. Weil, Pharm. Ztg. **57**, 677 (1912).
97. Weilandt, B. **29**, 2240 (1896).
98. Welmann, Pharm. Ztg. **47**, 798 u. 858 (1902).
99. Wimmer, Z. f. öff. Ch. **13**, 436 (1907).
100. Wolf, Z. f. öff. Ch. **12**, 186 (1906).

Ältere Literatur.

- Claus, Fr. **4**, 205 (1865).
Iwanow, Fr. **4**, 205 (1865).
Pelligot, Fr. **4**, 205 (1865).
Mulder, Wiggers Husemann, p. 148 (1870).
Petrik, Wiggers Husemann, p. 142 (1875).
Cazeneuve-Commaille, Extraction des Alcaloïdes, Paris 1875.

- Markownikoff, Berl. Ber. **9**, 1312 (1876).
Cazeneuve-Caillol, Berl. Ber. **10**, 243 (1877).
Legrip und Petit, Berl. Ber. **10**, 736 (1877).
Wynter Blith, Wiggers Husemann, p. 156 (1878).
Dragendorff, Pharm. Zentralhalle **20**, 192 (1880).
Eder, Fr. **19**, 371 (1880); Wiggers Husemann, p. 330 (1883/84).
Peckolt, Z. d. österr. Apoth.-Vereins, 1884.
Shimoyama-Meyer, Originalarbeiten über Teekultur, 1885.
van Ledden-Hulsebosch, Pharm. Zentralhalle **26**, 258 (1886).
Tittelbach, Ar. **225**, 171 (1887).
Losch, Pharm. Z. f. Rußland **17** (1887).
Dietrich, Helfenberger Annalen 1899.
Möller, Zeitschr. f. Nahrungs- und Genußmittel 1899.
Hilger, Zöller, Löwenthal, Commaille, Wité: Mitteilungen a. d. pharm.
Institut Erlangen 1890.
Dworkowitsch, Z. ang. Ch. **83**, 465 (1891).
Allen, Pharm. Journ. und Transactions 1159 (1892).
Doumergue und Nicolas, Ch. Z. **16**, 126 (1892).
Sokoloff, Ch. Z. **16**, 506 (1892).
Guillot, Apoth. Ztg., p. 132 (1893).
Petit und Terrat, Journ. pharm. et chim. **30**, 524 (1896).
Graf, Forschungsberichte über Lebensmittel 1897,
Brunner-Leins, Schweiz. Wochenschr. f. Chemie u. Pharm. **36**, 28 (1898).

Die ältere Literatur über Verfahren zur Bestimmung der Xanthinbasen in Kakao findet sich in der Dekkerschen Dissertation¹⁶ zusammengestellt.

Lebenslauf.

Ich, Hans Armin Oehrli von Matten bei Interlaken, wurde am 18. November 1892 geboren als Sohn des Hans Oehrli und der Elisabeth geb. Eggli. Ich besuchte in Interlaken die Primar- und Sekundarschule, bezog 1908 das städtische Gymnasium in Bern und bestand 1911 die Reifeprüfung. Nach Absolvierung der Praktikanten- und Gehilfenzeit in Bern und Freiburg und Ablegung des Apothekergehilfenexamens bezog ich 1915 die Universität Bern und besuchte Vorlesungen und Praktika bei den Professoren Dr. Kohlschütter, Dr. Tambor, Dr. Ephraim, Dr. Tschirch, Dr. Forster, Dr. Fischer, Dr. Studer, Dr. Herberz, Dr. Mauderli, Dr. Tunmann, Dr. Schaffer, Dr. Bürgi, Dr. Häberlin, Dr. Tumarkin, Dr. Hugli und Dr. Rytz. Ich bestand im Herbst 1917 das Staatsexamen als Apotheker. Nach erneuter Praxis begann ich 1919 die vorliegende Arbeit bei Herrn Prof. Dr. Eder im pharmazeutisch-chemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich.