Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 74 (1964)

Artikel: Untersuchungen zum Abbau des Kaffeins in den Blättern von Coffea arabica

Autor: Kalberer, Peter

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-52025

Nutzungsbedingungen

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

Conditions d'utilisation

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

Terms of use

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

Download PDF: 11.07.2025

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

Untersuchungen zum Abbau des Kaffeins in den Blättern von Coffea arabica

Von *Peter Kalberer*
aus Mels und Winterthur

Manuskript eingegangen am 25. Februar 1964

Inhalt

I. Einleitung und Problemstellung 64

II. Präparative Arbeiten 66

1. Radioaktive Verbindungen 67

a) Kaffein, C2-markiert 67
b) Kaffein, C8-markiert 68
c) Kaffein, Methyl-1-markiert 68
d) Kaffein, Methyl-7-markiert 69

2. Inaktive Verbindungen 69

a) Allantoinsäure 69
b) 1-Methylharnsäure 69
c) 3-Methylharnsäure 70
d) 7-Methylharnsäure 70
e) 1,7-Dimethylharnsäure 71
f) 3,7-Dimethylharnsäure 71
g) 1,3,7-Trimethylharnsäure 71
h) 3-Methylxanthin 72

III. Quantitative Kaffeinabbauuntersuchungen an *Coffea*-Blättern mit markiertem Kaffein 72

1. Methodik 72

a) Fütterungsverfahren 72
b) Blattkulturmethode 73
c) Versuchsanordnung 74
d) Allgemeine Grundsätze für GM-Messungen 75

2. Versuchsergebnisse 76

a) Vergleich von FG/F und TG/F von Blättern am Baum und Blättern in Wasserkultur 76
b) Kaffeingehalt der Blätter am Baum, verglichen mit dem Gehalt der Blätter in Wasserkultur 76
c) Fütterung von Tracer-Kaffein C8 77

3. Ergebnisse 79

IV. Untersuchung der $^{14}CO_2$-Ausscheidung 82
1. Zweck der Versuche 82
2. Methode 82
3. Bilanzversuch 82
4. Untersuchung der $^{14}CO_2$-Ausscheidung 84
V. Untersuchung der Abbauprodukte des Kaffeins 85
1. Literaturübersicht 85
2. Arbeitshypothese 89
3. Versuche 90
a) Untersuchung der Kaffeinfütterungslösung 90
b) Versuch A: Fütterung isolierter Blätter 91
c) Versuch B: Fütterung isolierter Blätter 93
d) Versuch C: Fütterung isolierter Blätter 94
e) Versuch D: Fütterung von Blättern am Baume 94
4. Diskussion 96
a) Zusammenfassende Darstellung der Radiographien 96
b) Identifikation der Verbindungen 97
5. Untersuchung des Allantoins 98
a) Versuchsanordnung 98
b) Ergebnisse 99
6. Untersuchungen zum Methylxanthin 100
7. Fütterung von Methyl-markiertem Kaffein 100
8. Zusammenfassende Diskussion: Abbauprodukte 102
VI. Zusammenfassung 104
Literaturverzeichnis 105

Verzeichnis der Abkürzungen

UV	Ultraviolett
IR	Infrarot
GM	Geiger-Müller
S	Standardabweichung
FG	Frischgewicht
TG	Trockengewicht
F	Fläche
A	Aufgenommene Kaffeinaktivität nach 1 Tag Fütterung
P	Gesamtaktivität im zermörserten Blatttrockenpulver nach dem Versuch
K	Kaffeinaktivität im Blatttrockenpulver nach dem Versuch
BAW	Laufmittel: Butanol : Eisessig : Wasser 4 : 1 : 1
AAW	Laufmittel: Äthanol : Eisessig : Wasser 81 : 5 : 14

I. Einleitung und Problemstellung

Das Kaffein ist einer der Pflanzenstoffe, die eine wichtige Rolle in unserem täglichen Leben spielen. Sein Vorkommen in Genussmitteln wie Kaffee und Tee und seine anregende Wirkung sind schon lange bekannt und geschätzt. Chemisch gesehen muss man es als 1,3,7-Trimethyl-2,6-dioxypurin oder kürzer als 1,3,7-Trimethylxanthin bezeichnen. Im allgemeinen zählt man es zu den Alkaloiden. Man versucht diese ausserordentlich uneinheitliche Gruppe von Pflanzenstoffen folgendermassen zu charakterisieren: Alkaloide sind N-haltige Pflanzenstoffe mit meist basischem Charakter. Der Stickstoff liegt oft in heterozyklischen Ringen vor. Viele Alkaloide sind pharmakologisch wirksam. In der Pflanze zeichnen sie sich durch verhältnismässig hohe Stoffwechselträgheit aus. Die Biogenese der Alkaloide nimmt ihren Anfangspunkt an verschiedenen Stellen des Intermediärstoffwechsels, sehr oft vom Stoffwechsel der Aminosäuren aus. So verschieden wie die Chemie der einzelnen Alkaloide und Alkaloidgruppen, so vielfältig ist auch die Biogenese der einzelnen Vertreter. Vom Kaffein nimmt man heute an, dass es aus Xanthin durch Methylierung entsteht (Anderson und Gibbs, 1962). Das Xanthin ist eine Verbindung, die in jeder lebenden Zelle gebildet wird. N-Methylierungen sind Reaktionen, die keine Besonderheit des pflanzlichen Stoffwechsels darstellen. Aus diesen beiden Überlegungen ist erkennbar, dass das Kaffein nicht weitab vom Intermediärstoffwechsel liegt. Alkaloide mit dieser Eigenschaft kommen meist weit verbreitet über das System der Pflanzen in verschiedenen Familien und Gattungen vor. Kaffein fand man bis heute in folgenden Gattungen: *Coffea, Thea, Ilex, Cola* und *Paullinia*. Die vorliegende Arbeit wurde nur an *Coffea arabica* L. durchgeführt.

Bis heute konzentrierte sich das Interesse der Physiologen und Biochemiker hauptsächlich auf Bildungsort, Biogenese und histochemische Lokalisation der Alkaloide (Mothes und Romeike, 1958). Den Chemikern lag die Isolierung und Strukturaufklärung am Herzen. Auf diesen Gebieten erzielte man auch schon beachtliche Erfolge. Nicht oder nur sehr wenig untersucht ist aber der Abbau von Alkaloiden in den Pflanzen. Das mag wohl damit zusammenhängen, dass man lange Zeit annahm, alle Alkaloide seien Endprodukte des Stoffwechsels und würden in den Pflanzen abgelagert und nicht mehr verändert. Aus der zusammenfassenden Arbeit von Mothes und Romeike (1958) geht aber hervor, dass Alkaloide verschiedener Gattungen der *Solanaceae* während des Wachstums mengenmässig zunehmen, um dann nach der Reife abzunehmen. Ähnliches fand man auch bei Vertretern der *Papaveraceae*.

Wir glauben, dass Untersuchungen auf dem Gebiete des Alkaloidstoffwechsels nicht nur interessante biochemische Fähigkeiten der Pflanzen

zeigen werden. Sie werfen auch von einer andern Seite her Licht in das noch weitgehend dunkle Kapitel der Stellung und Bedeutung der einzelnen Alkaloide. Betrachtet man die Pflanzen, deren Organe (z. B. die Blätter) und Zellen als Erscheinungen mit einer Zeit der Entstehung, des Wachstums, des Absterbens und mit einem Stoffwechsel, der sich mit dem Alter verändert, so scheint oft der Metabolismus von Alkaloiden mit diesen Alterungsvorgängen gekoppelt. (Zunahme während des Wachstums und Abnahme im Alter.) Auch in dieser Hinsicht sind interessante Erkenntnisse durch umfangreiche Untersuchungen über den biologischen Abbau an verschiedenen Alkaloiden zu erwarten.

Weevers (1930) untersuchte das Verhalten der methylierten Xanthinderivate an vielen verschiedenen Vertretern. Er stellte fest, dass deren Gehalt in den Blättern der diese Verbindung führenden Vertreter absolut gesehen bis zu einem Maximalwert zunimmt, um dann stetig abzunehmen. Bei *Coffea arabica* L. ermittelte er eine Zunahme des Kaffeingehaltes in Prozenten des Trockengewichtes bis zu einem Maximalwert und ein darauffolgendes kontinuierliches Abfallen. Wanner (1960) und Kende (1960) konnten diese Befunde bestätigen. Es gelang ihnen auch, zu zeigen, dass die Internodien sehr wenig Kaffein enthalten. In den Wurzeln wurde überhaupt keines gefunden. Schon Weevers (1930) fragte sich, wie diese Abnahme in den Blättern zu erklären sei. Er verglich den Kaffeingehalt junger und alter Blattstiele und stellte fest, dass nur junge, nicht aber alte Stiele Kaffein enthalten. Auch in der Rinde gelang es ihm nicht, eine Anhäufung von Kaffein festzustellen. Durch Ringelung und Entfernung der Sprossspitze wurde kein Kaffein über der Ringelungsstelle gestaut. Das Holz fand er frei von methylierten Xanthinderivaten. Alle diese Befunde sprachen gegen einen Abtransport als Erklärung der Kaffeinabnahme in den Blättern. Er schloss daraus auf einen Abbau des Kaffeins. Wanner und Blaim (1961) führten kinetische Studien durch, die in der gleichen Richtung weisen.

Für die Abnahme des Kaffeingehaltes in den *Coffea*-Blättern gibt es grundsätzlich drei Erklärungen:

1. Abbau des Kaffeins zu anderen Verbindungen;
2. Abtransport des Kaffeins in andere Pflanzenteile;
3. Einbau des Kaffeinmoleküls als Ganzes in andere Verbindungen.

Den bisherigen Untersuchern gelang es, den Abbau wahrscheinlich zu machen. Ihr Urteil gründete auf der Tatsache, dass die Internodien und Blattstiele wenig Kaffein enthalten. Sie schlossen daraus: Kaffein wird nicht transportiert. Es gelang ihnen aber noch nicht, den Abbau eindeutig durch Abbauprodukte zu beweisen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit folgenden Aufgaben, die auf dem Wege der Fütterung mit ^{14}C-markiertem Kaffein gelöst werden sollen:

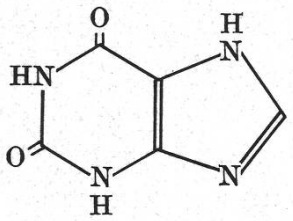
1. Wird Kaffein durch die Blätter abgebaut? Welchen Umfang nimmt dieser Abbau in Blättern von verschiedenem Alter und verschiedenen Pflanzen an?
2. Werden nennenswerte Mengen radioaktiver Abbauprodukte in den gefütterten Blättern gefunden?
3. Geben die gefütterten Blätter radioaktive Verbindungen ab?
4. Welche Verbindungen kommen als Abbauprodukte in Frage?

Welchen Weg nimmt der Kaffeinabbau in den Blättern der *Coffea arabica?* Ein Hauptteil der Versuche wurde an isolierten Blättern durchgeführt, die durch die Mittelrippe gefüttert wurden. Es sind auch Versuche beschrieben, bei welchen Blätter an intakten Pflanzen gefüttert wurden.

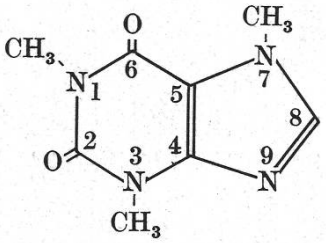
II. Präparative Arbeiten

Der wesentlichste Gesichtspunkt bei den präparativen Arbeiten war, in kurzer Zeit genügende Mengen der gewünschten Verbindungen herzustellen.

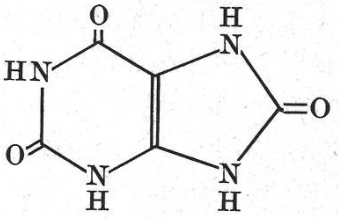
Formeln der wichtigsten Verbindungen:



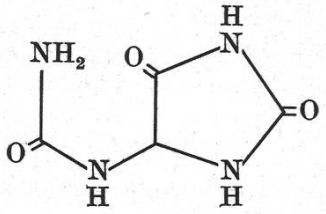
Xanthin



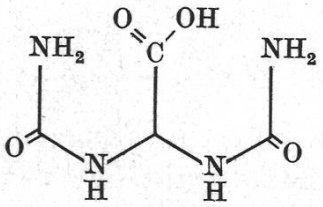
Kaffein



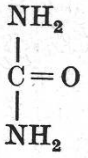
Harnsäure



Allantoin



Allantoinsäure



Harnstoff

1. *Radioaktive Verbindungen*

a) Kaffein C2-markiert

Syntheseweg: $BaCO_3 \rightarrow KCN \rightarrow KCNO \rightarrow$ Harnstoff $\rightarrow$ Cyanacetylharnstoff $\rightarrow$ 6-Amino-2,4-dioxypyrimidin $\rightarrow$ 5-Nitroso-6-amino-2,4-dioxypyrimidin $\rightarrow$ 5,6-Diamino-2,4-dioxypyrimidin (5,6-Diaminouracil) $\rightarrow$ Xanthin $\rightarrow$ Kaffein.

Das $BaCO_3$ wurde zusammen mit dem NH_4Cl in einem mit trockenem N_2 gespülten Supremax-Glasrohr gut gemischt. Man gab dann sauberes, metallisches Kalium ins Glasrohr, evakuierte es und schmolz es zu. Nachdem das Kalium vorsichtig verflüssigt wurde, mischte man den Rohrinhalt und erwärmte das Rohr für eine Stunde auf 640 °C in einem Muffelofen. Der Rohrinhalt wurde zuerst mit Methanol und dann mit wässrigem Methanol extrahiert, der Extrakt eingeengt, und in einer Destilliervorrichtung wurde ihm durch Ansäuern das Cyanid ausgetrieben und in Lauge aufgefangen. Die KCN-Lösung wurde in einem dickwandigen Zentrifugenglas zu frischgefälltem $Cu(OH)_2$ gegeben und das KCN während zweier Stunden bei 60 °C mit $KMnO_4$ zu KCNO oxydiert. Nach dem Kühlen der Lösung wurde das überschüssige $KMnO_4$ durch H_2O_2 zerstört und das entstandene MnO_2 abzentrifugiert. Man brachte die überstehende Lösung unter gutem Umrühren mit verdünnter H_2SO_4 auf pH 10–11 und engte im Vakuum schonend ein. Die eingeengte Lösung brachte man zusammen mit $(NH_4)_2SO_4$ und NH_3 in eine Glasampulle, die 60 Minuten auf 70 °C geheizt wurde. Das Reaktionsprodukt wurde auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft. Aus dem Trockenrückstand extrahierte man mit Butanol den Harnstoff, der nach dem Verdampfen des Butanols in schönen, langen Nadeln erschien. Den radioaktiven Harnstoff liess man in alkalischer Äthanollösung mit Cyanessigsäureäthylester auf dem siedenden Wasserbad 4 Stunden am Rückfluss unter Rühren kochen. Dann wurde Wasser zugegeben und 15 Minuten bei 75 ° weitergerührt, mit Eisessig leicht angesäuert und nochmals eine Stunde gerührt. Den sich bildenden Niederschlag von 6-Amino-2,4-dioxypyrimidin versetzte man in essigsaurer Lösung bei 80 °C mit $NaNO_2$. Das Nitrosoderivat wurde abzentrifugiert, ausgewaschen und mit Na-hydrosulfit ($Na_2S_2O_4$) auf dem Dampfbad reduziert. Das Diaminouracil-Bisulfit wurde abzentrifugiert, gewaschen und zur Reinigung in konzentrierter HCl zum Hydrochlorid umgefällt. Das trockene Diaminouracil-HCl erhitzte man zusammen mit Formamid für 25 Minuten auf 200 °C. Das entstandene Xanthin wurde mehrmals umgefällt und in einem weiten, kurzen Reagenzglas mit Magnetrührvorrichtung in Wasser von 30–40 °C suspendiert. Dimethylsulfat und NaOH wurden in kleinen Portionen eingetragen, so dass das pH zwischen 8–9 blieb. Der pH-Wert wurde durch eine kleine pH-Messelektrode, die sich in der Reaktionslösung befand,

überwacht. Die Reaktion dauerte ungefähr 3 Stunden. Nach schwachem Ansäuern dampft man die Lösung zur Trockene ein. Der Trockenrückstand wurde mit Chloroform extrahiert, das Chloroform abgedampft und das Kaffein durch zweimalige Sublimation bei 110–130 °C und 0,01 Torr gereinigt. Anschliessend wurde es an einer Aluminiumoxydsäule chromatographiert. Die Reinheit des Präparates wurde durch Autoradiographie eines Papierchromatogrammes untersucht (vgl. Abschnitt V). Es zeigte sich nur Radioaktivität im Kaffein.

Spezifische Aktivität: 790 μC/mM.

Verfahren zusammengestellt nach: Murray-Williams (1958), Sixma et al. (1954), Haley und Lambooy (1954), Organic Synthesis vol. 37 (1957), Bredereck et al. (1950).

b) Kaffein C8-markiert

Syntheseweg: KCN→HCOOH→Xanthin→Kaffein.

Eine KCN-Lösung, die wie im vorangegangenen Versuche hergestellt wurde, erhitzt man in 0,5 N NaOH in einem Pyrex-Bombenrohr für 5 Stunden auf 170–180 °C. Die dabei entstandene Na-formiat-Lösung wurde angesäuert und der Niederschlag abzentrifugiert. Der überstehenden Lösung fügte man Glykol zu und liess sie mit Diaminouracil-HCl reagieren. Es wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt, dann zirka 3 Stunden bei 80 °C und endlich 1–2 Stunden bei 200°C. Nachher wurde gekühlt, der Niederschlag abzentrifugiert und das Xanthin mehrmals mit KOH und H_2SO_4 umgefällt und getrocknet. Die Methylierung, die Reinigung und die Reinheitskontrolle wurden gleich wie bei der C2-Markierung durchgeführt.

Spezifische Aktivität: 2,24 mC/mM.

Verfahren zusammengestellt nach Sprinson und Rittenberg (1952), Weygand und Grosskinsky (1951), Bredereck et al. (1950).

c) Kaffein Methyl-1-markiert

Syntheseweg: Theobromin→Kaffein.

Das Theobromin wurde in alkalischer Lösung mit markiertem CH_3J im Bombenrohr mit Rückflusskühler für 2 Stunden auf 80 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch dampfte man zur Trockene ein. Die Reinigung und die Reinheitskontrolle wurden wie bei der C2-Markierung durchgeführt.

Spezifische Aktivität: 75 μC/mM.

Verfahren nach Murray und Ronzio (1954).

d) Kaffein Methyl-7-markiert

Syntheseweg: Theophyllin→Kaffein.

Das Vorgehen war gleich wie das unter c beschriebene, nur wurde an Stelle von Theobromin Theophyllin verwendet.

Spezifische Aktivität: 171 μC/mM.

Verfahren nach Murray und Ronzio (1954).

2. *Inaktive Verbindungen*

Die inaktiven Verbindungen wurden als Testsubstanzen für chromatographische Untersuchungen verwendet.

a) Allantoinsäure

Syntheseweg: Allantoin→Allantoinsäure.

Das Allantoin liess man 12 Stunden in stark alkalischer Lösung bei Zimmertemperatur reagieren. Dann wurde unter Eiskühlung vorsichtig mit HCl angesäuert, der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen und vorsichtig getrocknet.

Allantoinsäure: N ber. 31,82% N gef. 31,84%.

Verfahren nach Behrend und Schultz (1909).

b) 1-Methylharnsäure

Syntheseweg: Theobromin→Methylalloxan→1-Methylviolursäure→1-Methyluramil→1-Methylpseudoharnsäure→1-Methylharnsäure.

Das Theobromin wurde mit $KClO_3$ in salzsaurer Lösung oxydativ abgebaut und das entstandene Alloxan mit Hydroxylamin-HCl zur Methylviolursäure umgesetzt. Diese reduzierte man mit salzsaurer $SnCl_2$-Lösung bei Zimmertemperatur zum 1-Methyluramil. Das Methyluramil wurde mit KCNO zur Reaktion gebracht und die dabei entstandene 1-Methylpseudoharnsäure einige Stunden in 20% HCl auf dem Dampfbad erhitzt. Die 1-Methylharnsäure fiel als weisses, kristallines Pulver aus und wurde aus heisser NaOH mit HCl umkristallisiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und bei 150 °C getrocknet.

1-Methylharnsäure: N ber. 30,77% N gef. 30,43%.

Verfahren zusammengestellt nach Biltz (1912), Biltz und Klein (1925), Biltz und Max (1921), Fischer und Clemm (1897).

c) 3-Methylharnsäure

Syntheseweg: Cyanessigsäure + Methylharnstoff→Cyanacetylmethylharnstoff→3-Methyl-4-amino-2,6-dioxypyrimidin→3-Methyl-4-amino-5-nitroso-2,6-dioxypyrimidin→3-Methyl-4,5-diamino-2,6-dioxypyrimidin→3-Methylharnsäure.

Cyanessigsäure und Methylharnstoff wurden in Pyridin gelöst und $POCl_3$ unter Rühren zugetropft. Den entstandenen Cyanacetylmethylharnstoff fällte man mit Wasser aus und kristallisierte den Niederschlag aus heissem Wasser um. Den feingepulverten Cyanacetylmethylharnstoff erwärmte man in 20% NaOH und erreichte so den Ringschluss zum Na-Salz des 3-Methyl-4-amino-2,6-dioxypyrimidin. Diese Verbindung wurde mit Eisessig angesäuert und der sich bildende Niederschlag abfiltriert und ausgewaschen. Das 3-Methyl-4-amino-2,6-dioxypyrimidin löste man in siedend heissem Wasser und setzte es in essigsaurer Lösung mit $NaNO_2$ zum 5-Nitrosoderivat um. Das ausgefallene Nitrosoderivat wurde mit Schwefelammonium zum entsprechenden 5-Aminoderivat reduziert. Der entstandene Schwefel wurde abfiltriert, die Lösung mit NH_3 übersättigt und das ausgefallene Diaminoderivat abfiltriert. Dieses löste man in einer äquimolaren Menge verdünnter HCl und setzte es unter Schütteln mit Chlorkohlensäureester um. Das entstandene Urethan wurde einige Stunden auf 240 °C erwärmt. Das Endprodukt, 3-Methylharnsäure, reinigte man in schwach alkalischem, heissem Wasser mit Tierkohle. Dann wurde die 3-Methylharnsäure aus verdünnter KOH mit HCl umkristallisiert und der Niederschlag mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen und bei 150 °C getrocknet.

3-Methylharnsäure: N ber. 30,77% N gef. 30,43%.

Verfahren nach Traube (1900).

d) 7-Methylharnsäure

Syntheseweg: Alloxan→Dialursäure→7-Methyluramil→7-Methylpseudoharnsäure→7-Methylharnsäure.

Alloxan wurde in salzsaurer $SnCl_2$-Lösung in der Hitze rasch reduziert. Die dabei entstandene Dialursäure brachte man in siedendem Wasser mit 33% Methylamin in essigsaurer Lösung zur Reaktion. Das 7-Methyluramil wurde bis zur Kristallisation eingeengt, abgesaugt und getrocknet. Dann setzte man es mit KCNO in siedendem Wasser um, säuerte nach 1 Stunde mit 20% HCl an und erhitzte sofort auf dem siedenden Wasserbad für 1 Stunde. Die 7-Methylharnsäure kristallisierte in der Kälte aus und wurde aus heissem Wasser umkristallisiert und bei 140 °C getrocknet.

7-Methylharnsäure: N ber. 30,77% N gef. 30,76%.

Verfahren zusammengestellt nach Baeyer (1863), Biltz und Damm (1913), Biltz et al. (1921).

e) 1,7-Dimethylharnsäure

Syntheseweg: Theobromin→Methylalloxan→1-Methyldialursäure→1,7-Dimethyluramil→1,7-Dimethylpseudoharnsäure→1,7-Dimethylharnsäure.

Das Theobromin wurde in salzsaurer Lösung mit $KClO_3$ oxydativ abgebaut und das entstandene Methylalloxan mit salzsaurer $SnCl_2$-Lösung zur Methyldialursäure reduziert. Diese setzte man in siedendem Wasser mit 33 % Methylaminlösung in essigsaurer Lösung um und engte bis zur Kristallisation ein. Das 1,7-Dimethyluramil wurde abfiltriert und in heissem Wasser mit KCNO zur Reaktion gebracht. Nach dem Ansäuern mit 20 % HCl erhitzte man die Lösung 1 Stunde auf dem heissen Wasserbad. Die 1,7-Dimethylharnsäure kristallisierte in der Kälte aus, wurde mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 130 °C getrocknet. Es war zuwenig Material zum Umkristallisieren vorhanden. Die Verbindung erwies sich als papierchromatographisch einheitlich.

1,7-Dimethylharnsäure: N ber. 28,57 % N gef. 27,51 %.

Verfahren zusammengestellt nach Biltz und Damm (1913).

f) 3,7-Dimethylharnsäure

Syntheseweg: 7-Methylharnsäure→3,7-Dimethylharnsäure.

7-Methylharnsäure wurde in der Siedehitze als Pb-Salz ausgefällt und bei 130 °C gut getrocknet. Das Pb-Salz erhitzte man mit einer äquivalenten Menge Methyljodid in Äther für 12 Stunden auf 170–175 °C. Die sich bildende gelbe Masse wurde in Wasser gelöst und die Bleiionen als Sulfid gefällt. Die wässrige Lösung engte man ein, versetzte sie heiss mit Tierkohle, filtrierte die Tierkohle ab und liess in der Kälte die 3,7-Dimethylharnsäure auskristallisieren. Die Kristalle wurden gewaschen und bei 110 °C getrocknet.

3,7-Dimethylharnsäure: N ber. 28,57 % N gef. 28,20 %.

Verfahren nach Fischer (1897).

g) 1,3,7-Trimethylharnsäure

Syntheseweg: 3,7-Dimethylharnsäure→1,3,7-Trimethylharnsäure.

3,7-Dimethylharnsäure wurde in 2n NaOH gelöst und mit einem Überschuss an Dimethylsulfat kräftig geschüttelt. Die Lösung befreite man von überschüssigem Dimethylsulfat.

Verfahren nach Biltz und Damm (1917).

h) 3-Methylxanthin

Syntheseweg: 3-Methylharnsäure→3-Methyl-8-chlor-xanthin→ 3-Methylxanthin.

3-Methylharnsäure liess man in einer Ampulle während 9 Stunden bei 130–140 °C mit $POCl_3$ reagieren. Nachdem das überschüssige $POCl_3$ abdestilliert war, kochte man das Reaktionsprodukt 3 Stunden im Alkohol am Rückfluss. Den vom Alkohol befreiten Rückstand reduzierte man in wässriger Lösung mit HJ in Gegenwart von PJ_3. Das 3-Methylxanthin wurde UV-spektroskopisch durch Messen der Spektren bei 2 verschiedenen pH-Werten identifiziert (Gulland et al., 1934).

Verfahren nach Fischer und Ach (1898).

Sämtliche methylierten Harnsäuren und Xanthine wurden papierchromatographisch untersucht. Sie erwiesen sich als einheitlich, und ihre Rf-Werte waren vergleichbar mit jenen von Dikstein et al. (1956).

III. Quantitative Kaffeinabbauuntersuchungen an Coffea-Blättern mit markiertem Kaffein

Die Ziele dieser Versuche sind, festzustellen:

1. Wird Kaffein durch die Blätter abgebaut? Welchen Umfang nimmt dieser Abbau in Blättern von verschiedenem Alter und verschiedenen Pflanzen an?
2. Werden messbare Mengen radioaktiver Abbauprodukte in den gefütterten Blättern gefunden?

1. Methodik

a) Fütterungsverfahren

Es bestehen folgende Möglichkeiten der Fütterung:

1. Die Fütterung intakter Pflanzen durch die Mittelrippe einzelner Blätter oder durch die Blattoberfläche (vgl. Fig. 8).
2. Fütterung abgeschnittener Zweige durch Einstellen in die Fütterungslösung.
3. Fütterung einzelner abgeschnittener Blätter durch den Blattstiel.
4. Fütterung mit der Blattscheibenmethode durch Vakuuminfiltration.

Zu 1. Die Fütterung einzelner Blätter ganzer Pflanzen ist die natürlichste und, wenn sie anwendbar ist, die beste Methode. Aber eine Bilanz der

Radioaktivität ist bei diesem Verfahren praktisch unmöglich. Die radioaktiven Verbindungen werden weit ausserhalb des Blattes verteilt.

Zu 2. Die Fütterung von ganzen Zweigen besitzt keine wesentlichen Vorteile gegenüber der Einzelblattfütterung. Sie besitzt aber den Nachteil, dass die Blätter nicht einzeln untersucht werden können.

Zu 4. Die Infiltration von Lösungen in Blattscheiben ist die unnatürlichste der 4 Methoden. Die Blattscheiben sind nur einige Tage haltbar, der Kaffeinabbau geht aber langsam vor sich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fütterung einzelner Blätter durch den Blattstiel gewählt. Die Vorteile dieser Methode sind im folgenden Abschnitt besprochen.

b) Die Blattkulturmethode

Einzelne Blätter werden vom Baume losgelöst, gefüttert und einzeln untersucht.

Vorteile:

1. Geschlossenes System, das eine Bilanz der Radioaktivität erlaubt.
2. Es können einzelne Blätter für sich untersucht werden.
3. Gute Lebensdauer der kräftigen, tiefgrünen Blätter. Oft zeigten sie auch nach 20 Tagen noch keine äusserlich sichtbaren Spuren eines Absterbens (kein Welken oder Austrocknen).
4. Durch den verhinderten Abtransport tritt vielleicht eine Anhäufung von Abbauprodukten ein (Stauwirkung).

Nachteile:

1. Unnatürliche Bedingungen, der Stoffwechsel von Blättern an Bäumen unterscheidet sich von jenem einzelner, weggeschnittener Blätter. Die Pflanze ist ein Ganzes, und alle Teile sind für den normalen Ablauf des Stoffwechselgeschehens notwendig. Beispielsweise könnte durch den verhinderten Abtransport von Abbauprodukten das Stoffwechselgeschehen auf Bahnen gelenkt werden, die unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen.
2. Geringerer Wassergehalt der Blätter.
3. Das Einsaugen und die Verteilung der Fütterungslösung geht langsam vor sich. Die Blätter der *Coffea* sind lederig.
4. Unter der Annahme, dass die kaffeinführenden Zellen selbst Abbauaktivität aufweisen, besteht folgende Verschiedenheit: Das blatteigene Kaffein befindet sich in den Zellen, das gefütterte muss von aussen in

die Zellen eindringen. Diese Tatsache könnte eine verschiedene Abbaugeschwindigkeit von gefüttertem und vorhandenem Kaffein erklären.

c) Versuchsanordnung

1. Herstellen einer Kaffeinlösung (C8-Kaffein) und ausmessen der Aktivität je Volumeneinheit.

2. Zirka 200 μl der Fütterungslösung (30–80 γ Kaffein) in die Fütterungsgläschen einwägen.

3. Blätter rasch mit scharfer Klinge vom Baum schneiden und mit dem Stiel in die Fütterungsgläser eintauchen (Reagenzgläschen 7 mm Durchmesser, 15 mm lang).

4. Während zirka 8 Stunden in den Fütterungsgläsern lassen. Ort: Die Fütterungen wurden im Gewächshaus neben den Kaffeebäumen durchgeführt, damit sich die Aussenbedingungen für das Blatt nach dem Wegschneiden nicht sprungartig ändern. Licht: Diffuses Tageslicht. Temperatur: Zirka 20 °C. Feuchtigkeit: 50–90 %.

5. Nach der Fütterungszeit Blatt vorsichtig herausheben, Blattstielbasis gut abspülen, Fütterungsgefäss ebenfalls sorgfältig ausspülen, Wägen der gesamten Spülwassermenge und Bestimmen der Aktivität (= Rückgewinn an nicht aufgenommenem Kaffein). Aus der angebotenen Aktivität und dem Rückgewinn wird die aufgenommene Menge A berechnet, A = 100 %.

6. Blätter mit der Blattstielbasis in Brunnenwasser stellen (Bechergläser). Sie bleiben für die ganze Versuchsdauer unter den gleichen Aussenbedingungen wie die Kaffeebäume.

7. Bei Versuchsabbruch: a) Blattfrischgewicht (FG), b) Blattfläche messen (F). Blatt für eine Stunde in den Trockenschrank bei 80–100 °C, dann für 2 Tage bei 60 °C (Gewichtskonstanz).

8. Bestimmen des Trockengewichtes (TG), Zerreiben der Blätter im Mörser. Entnahme der Proben für die Aktivitätsmessungen im Trockenpulver, 2–3 Proben, Messwert P. Einwaage des Trockenmaterials, das extrahiert wird.

9. *Extraktion*: Abgeändert nach Kogan u. a. (1953), Paech und Tracey (1955), Kende (1960).

   a) 10 ml H_2O, 2,5 ml 0,05n H_2SO_4 zugeben.

   Mitführen eines Standards mit 10 ml Testlösung (2 mg/ml) einer inaktiven Kaffeinlösung und einer gewogenen Menge aktiver

Kaffeinlösung, die Verluste der Extraktion und der folgenden Operationen werden korrigiert, wobei die Werte des Standards als 100 % angenommen werden. Doppelte Kontrolle: UV-Messung und GM-Messung.

b) Kochen der Lösung während 20 Minuten, abkühlen lassen und 1,3 g schweres MgO eintragen, nochmals 20 Minuten kochen und abkühlen lassen.

c) Durch Filtertiegel G4 saugen, gutes Auswaschen der Glaswaren, des Tiegels und des Niederschlags, gesamtes Volumen in Becherglas bei 60–70 °C zur Trockene eindampfen.

d) Trockenrückstand mit 1–2 ml Wasser aufnehmen, für 1–2 Stunden stehen lassen unter öfterem Umschwenken der Lösung. Messen des Volumens der Lösung.

e) Aus Becherglas Extrakt direkt auf das Chromatogramm auftragen (30–50 μl), je 3 Flecken für UV-Messungen und je 3 Flecken für GM-Messungen. Laufzeit: Zirka 15 Stunden. Laufmittel: *n*-Butanol : NH_3 : Wasser 86 : 5 : 14.

10. *UV-Messungen*: Flecken ausschneiden und mit 10 ml HCl 0,1n in Reagenzgläsern 12–24 Stunden eluieren. Messungen am Beckmanspektrophotometer bei 272 mμ.

11. *GM-Messungen*: Flecken ausschneiden und mit 3–5 ml Kaffeinlösung während 24–48 Stunden eluieren, sämtliche Volumen werden durch genaue Messungen bestimmt, von jedem Flecken wird eine Probe auf einem Schälchen eingedampft und mit dem GM-Zähler ausgemessen (= Werte K).

d) Allgemeine Grundsätze für die GM-Messungen

1. Für alle Messungen:

Titer der Fütterungslösung,

Rückgewinn an nicht aufgenommenem Kaffein,

Rückgewinn an nicht umgesetztem Kaffein aus den Blättern (Wert K), wurde darauf geachtet, dass genau gleiche Mengen Kaffein pro Schälchen abgedampft wurden. Diese Bedingung wurde erfüllt durch Zugabe von inaktivem Kaffein. Bei diesem Vorgehen mussten keine Selbstabsorptionen bestimmt und in Rechnung gezogen werden. Für Titerbestimmungen wurden 8–28 Schälchen, für Rückgewinnmessungen 3–5 Schälchen und für Eluate pro Blatt je 3 Schälchen gemessen und aus den ermittelten Werten der Mittelwert berechnet. Die Streu-

ung der einzelnen Messwerte wird durch die verschiedene Verteilung des auskristallisierten Kaffeins auf dem Schälchen verursacht. s (aus 21 Messungen) 2,8 % für die Einzelmessung, für Mittelwerte aus mehreren Messungen entsprechend geringer.

2. Das Trockenpulver wurde in Schälchen mit ∞ Schichtdicke gemessen. Die Messungen mit abgedampften Kaffeinlösungen und jene mit ∞ Schichtdicken wurden folgendermassen verglichen: Eine radioaktive Kaffeinlösung wurde hergestellt und ein Teil davon auf Schälchen abgedampft. Der Rest der Lösung wurde zur Trockene eingedampft und der Rückstand pulverisiert und in Schälchen mit ∞ Schichtdicke gemessen. Aus diesen beiden Messungen der gleichen Lösung wurde der Umrechnungsfaktor bestimmt.
   Streuung für Messungen mit ∞ Schichtdicke: s = 2 % (aus 28 Messungen pro Einzelmessung). Pro Blatt wurden 3 Proben hergestellt.

3. Bei jeder Messung wurden Standardplättchen ^{14}C mitgemessen. Sämtliche Messungen wurden auf eine Einheitszeit für ein Standardplättchen korrigiert. Auf diese Weise wurden Schwankungen im Zählgerät eliminiert.

2. *Versuchsergebnisse*

a) Vergleich von Frischgewicht (FG) pro Fläche (F) und Trockengewicht (TG) pro Fläche von Blättern am Baum und Blättern in Wasserkultur

Untersucht wurden 20 Blattpaare von verschiedenem Alter und unterschiedlichen Bäumen. 20 Blätter wurden für die Versuchsdauer von durchschnittlich 13 Tagen mit der Blattstielbasis in Brunnenwasser gesteckt. Die 20 Gegenblätter blieben am Baum und wurden gleichzeitig mit den Blättern in Wasserkultur geerntet (*Coffea arabica* besitzt gegenständige Blätter). FG/F in Wasserkultur durchschnittlich 9 % tiefer, TG/F in Wasserkultur durchschnittlich 10 % höher als am Baume.

Die äusseren Bedingungen (Licht, Temperatur, Feuchtigkeit) waren für die Blätter am Baum und in Wasserkultur die gleichen.

b) Kaffeingehalt der Blätter am Baum, verglichen mit dem Gehalt der Blätter in Wasserkultur

Untersucht wurden insgesamt 4 Gruppen von 5 Blattpaaren. Das eine Blatt der Paare wurde bei Versuchsbeginn abgeschnitten und in ein Wassergefäss gebracht. Das Gegenblatt blieb am Baume. Nach der Versuchszeit wurden beide Blätter geerntet.

Gruppe 1: Versuchsdauer: 10 Tage, Blattpaare nach dem Alter numeriert, von einem Zweig aus der 9. Etage (von oben) eines mehrjährigen Baumes.

Blattpaar	Wasserkultur Kaffein γ/cm^2	Baum Kaffein γ/cm^2	
1 jüngstes	64,9	47,1	noch wachsend
2	38,7	36,0	
3	32,6	28,2	
4	13,2	12,2	
5 ältestes	5,3	9,7	

Gruppe 2: Versuchsdauer: 20 Tage, Blattpaare nach dem Alter numeriert, von der Hauptaxe eines zweijährigen Bäumchens.

Blattpaar	Wasserkultur Kaffein γ/cm^2	Baum Kaffein γ/cm^2	
1 jüngstes	74,1	59,9	noch wachsend
2	47,4	51,2	
3	30,2	32,9	
4	39,7	33,9	
5 ältestes	24,8	22,2	

c) Fütterung von Tracer-Kaffein C8

Es wurden insgesamt 8 Versuche mit je 5 Blattpaaren durchgeführt. Zwei davon sind auf Seite 18 graphisch dargestellt (Fig. 1).

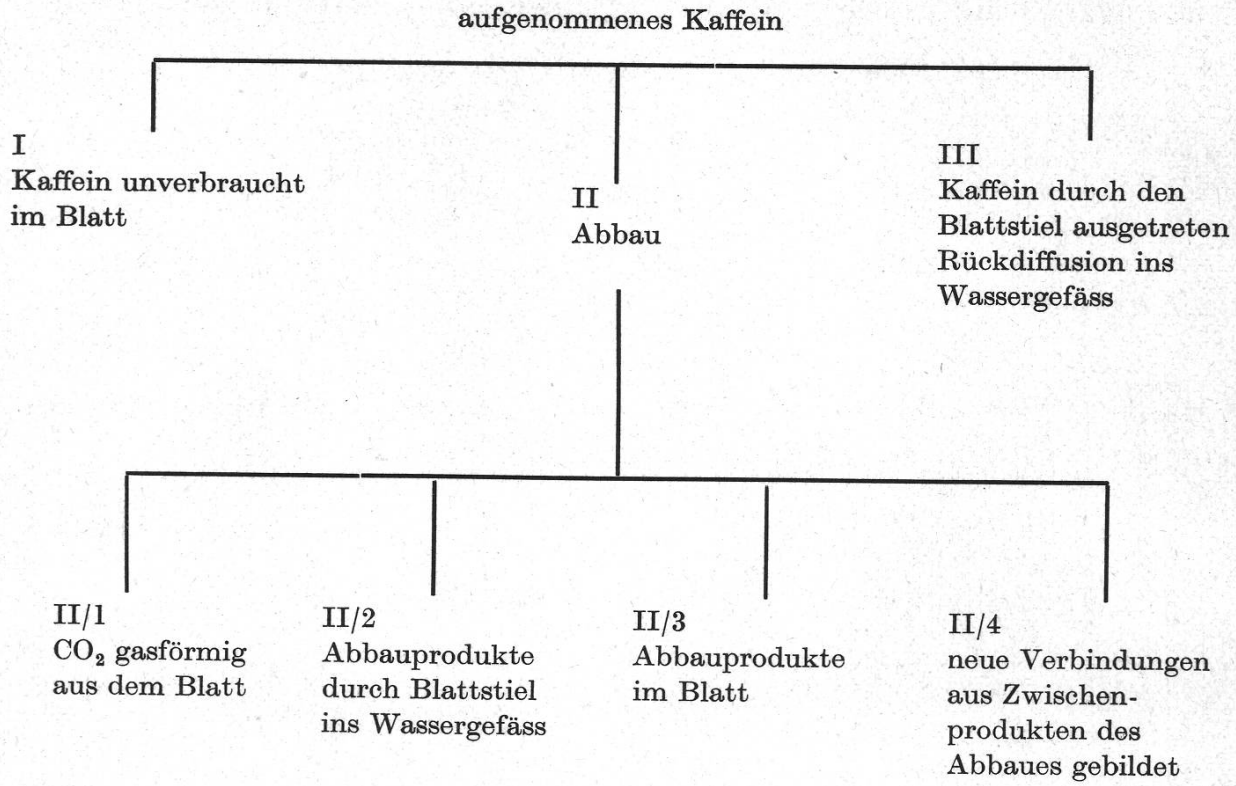
Das eine Blatt der Paare wurde bei Versuchsbeginn abgeschnitten und mit markiertem Kaffein gefüttert (vgl. Abschnitt III, 1 c, Versuchsanordnung). Das Gegenblatt wurde zur gleichen Zeit entfernt und sofort verarbeitet (d. h. gemessen, extrahiert, Kaffein bestimmt).

Als Versuchspflanze für die dargestellten Versuche diente ein mehrjähriger Baum mit 13 Etagen von blatttragenden Zweigen. Beim Versuch «junge Blätter» stammten diese von einem Zweige der 6. Etage (von oben). Die jüngsten Blätter dieses Zweiges waren noch nicht ausgewachsen. Beim Versuch «alte Blätter» stammten diese von einem Zweig der 11. Etage (von oben).

Versuchsdauer: 10 Tage.

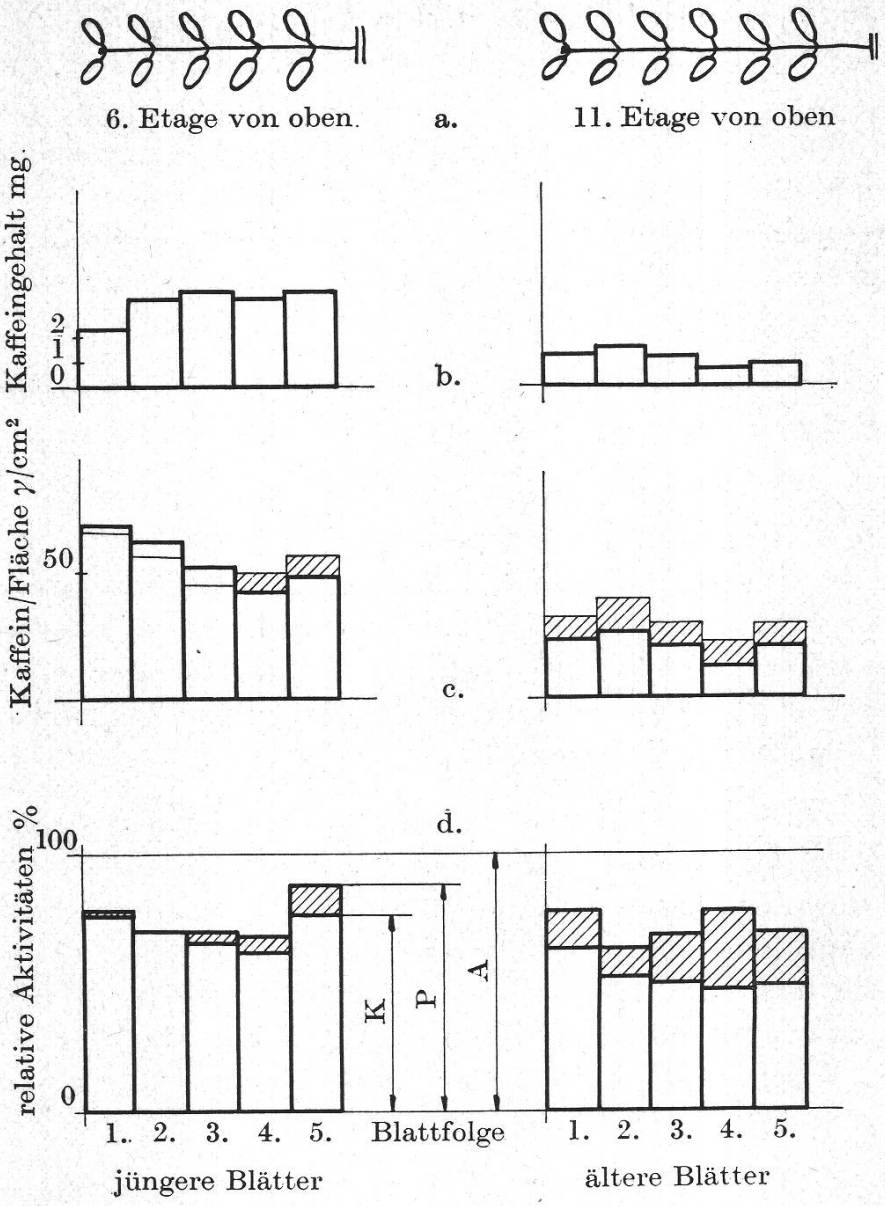
Für das während der 8 Stunden Fütterungszeit aufgenommene, radioaktive Kaffein ergibt sich für den Versuch folgendes Verteilungsschema:

Verteilungsschema bei der Fütterung isolierter Blätter



In das oben angegebene Verteilungsschema soll Einblick verschafft werden. Es werden folgende Grössen bestimmt:

1. Aufgenommene Aktivität an Kaffein, A.
2. Gesamtaktivität im zerriebenen, getrockneten Blattmaterial, P.
3. Zurückgewonnene Aktivität an nicht umgesetztem Kaffein, K.



Figur 1

Quantitative Abbauuntersuchungen

a) Versuchszweig mit Numerierung der Blattfolge
b) mg Kaffein pro gefüttertes Blatt bei Versuchsende
c) — Kaffein pro cm² gefüttertes Blatt bei Versuchsende
— Kaffein pro cm² nichtgefüttertes Gegenblatt bei Versuchsbeginn
d) A Aktivität aufgenommenes Kaffein nach 1 Tag Fütterung (100 %)
P Aktivität im zermörserten Blatttrockenpulver bei Versuchsende in %
K Kaffeinaktivität aus Versuchsblättern nach dem Versuch in %

3. Ergebnisse

Die wichtigsten Fragen dieser Versuchsgruppe, wird Kaffein in den Blättern abgebaut und werden messbare Mengen radioaktiver Abbauprodukte in den Blättern gespeichert, können in bejahendem Sinne beantwortet werden. Als Hinweis auf einen Abbau betrachte ich die Differenzen (P–K) zwischen den Aktivitäten im zerriebenen Trockenmaterial und den

Kaffeinaktivitäten, welche am Ende der Versuche in den Blättern noch gefunden werden. Diese Differenzen zeigen, dass aus dem Kaffein andere Verbindungen gebildet werden und dass diese Verbindungen im Blatt in messbaren Mengen vorliegen. Bei der Differenz (A–P) zwischen der vom Blatt aufgenommenen Aktivität und der im Blatttrockenmaterial gefundenen muss berücksichtigt werden, dass vom Blatt aufgesaugtes Kaffein im Wassergefäss nach der Fütterung wieder austritt und so in die Differenz A–P eingeht (vgl. Abschn. IV).

Der Fütterungsmethode lassen sich mehrere Nachteile vorwerfen. Verschiedene davon wurden für diesen speziellen Versuch des Kaffeinabbaues genauer untersucht.

Zweifellos ist der Stoffwechsel isolierter Blätter merklich verschieden von jenem der Blätter am Baume. Man vergleiche die Untersuchungen über die Trockengewichte pro Flächeneinheit. Die isolierten Blätter assimilieren weiter, und es wird praktisch nichts abtransportiert, so dass sie nach der Versuchszeit ein höheres Trockengewicht aufweisen als entsprechende Blätter am Baume.

In einem weiteren Versuch wurde die Abnahme des Kaffeins/Fläche an Blättern am Baum und Blättern in Wasserkultur untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei ausgewachsenen Blättern, in denen der Kaffeingehalt abnimmt, kein merklicher Unterschied zwischen dieser Abnahme bei isolierten Blättern und Blättern am Baume besteht (vgl. Abschn. 2b). Bei jungen, stark wachsenden Blättern zeigen sich starke Unterschiede, die mit dem Wachstum im Zusammenhang stehen. Die Kaffeinzunahme ist nicht proportional der Flächenzunahme.

Es wurde die Frage aufgeworfen, ob der Abbau des im Blatte vorhandenen Kaffeins vergleichbare Grössenordnung besitzt wie der Abbau von gefüttertem, radioaktivem Kaffein. Die graphische Darstellung Figur 1 zeigt, dass die Verhältnisse:

$$\frac{\text{Kaffein/Fläche vor Versuch} - \text{Kaffein/Fläche nach Versuch}}{\text{Kaffein pro Fläche vor Versuch}}$$

und

$$\frac{\text{Aktivität Trockenpulver (P)} - \text{Aktivität Kaffein (K)}}{\text{Aktivität Trockenpulver (P)}}$$

bei ausgewachsenen Blättern in vergleichbarer Grössenordnung liegen. (Die CO_2-Verluste fallen nicht wesentlich ins Gewicht.) Der Abbau an aktivem Kaffein ist geringer. Bedenkt man, dass das aktive Kaffein aufgesaugt und verteilt werden muss, so ist diese Beobachtung begreiflich. Die ledrigen *Coffea*-Blätter saugen nicht sehr stark.

Diese Untersuchungen zeigen, dass von aussen gefüttertes Kaffein bezüglich des Abbaues nicht wesentlich von blatteigenem unterschieden wird.

Die jüngsten, noch wachsenden Blätter zeigen nur kleine Unterschiede zwischen P und K. Zwei Annahmen sind möglich:

1. kein Abbau oder nur geringer Abbau, der wenig Abbauprodukte liefert, oder
2. der Abbau und die Verarbeitung der Abbauprodukte gehen sehr rasch vor sich, so dass von den letzteren nur geringe Spuren vorhanden sind.

In den jungen wachsenden Blättern nimmt der absolute Kaffeingehalt zu. Wäre nun nach 2. ein beachtlicher Abbau vorhanden, so müsste er von der Synthese übertroffen werden.

Die Annahme, dass nebeneinander ein starker Abbau und ein noch stärkerer Aufbau vorhanden sind, ist aus folgenden Gründen unhaltbar:

Aus der Arbeit von Wanner und Blaim (1961) geht hervor, dass in jungen Blättern nach einer kurzzeitigen Fütterung von $^{14}CO_2$ die spezifische Aktivität des Kaffeins anfänglich ansteigt, um sodann ganz langsam abzunehmen. Würde in jungen Blättern Kaffein rasch auf- und abgebaut, so wäre die spezifische Aktivität nach der Zunahme nicht nahezu konstant, sondern zeigte ein ähnliches Verhalten wie in der gleichen Arbeit die Glukose, nämlich nach anfänglich rascher Zunahme eine rasche Abnahme. Für junge noch wachsende Blätter sind folgende Verhältnisse wahrscheinlich:

Ihre Abbauaktivität ist gering oder gleich Null.

Die abgebaute Kaffeinaktivität setzt sich zusammen aus P–K und dem Teil von A–P, der durch abgegebene, radioaktive Abbauprodukte gebildet wird (z. B. CO_2 vgl. Abschn. IV). Die jungen ausgewachsenen Blätter mit hohem Kaffeingehalt zeigen im allgemeinen kleinere (P–K) Werte als die kaffeinarmen alten Blätter. Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass in alten Blättern ein grösserer Teil des aufgesaugten Kaffeins abgebaut wird. Man vergleiche bezüglich (P–K) (Fig. 1)

1. den alten Zweig mit dem jungen Zweige;
2. die verschiedenen alten Blätter eines Zweiges vom Stamm zur Sprossspitze.

Wichtig für die weiteren Versuche ist die nun mögliche Beantwortung der Frage: Welche Blätter speichern grosse Mengen radioaktiver Abbauprodukte und sind damit günstige Objekte zu deren qualitativer Bestimmung? Aus den in diesem Abschnitt beschriebenen Versuchen geht eindeutig hervor, dass mit Vorteil ausgewachsene ältere Blätter gefüttert werden.

IV. Untersuchung der $^{14}CO_2$-Ausscheidung

1. Zweck der Versuche

Mit den Versuchen wird beabsichtigt, Licht in die Differenz (A–P) zwischen der Aktivität des aufgesaugten, radioaktiven Kaffeins und jener des zerriebenen Trockenmaterials zu bringen. Es sollte eine möglichst genaue Bilanz der Radioaktivität erstellt werden und besonders der vermuteten Ausscheidung von radioaktivem CO_2 bei verschieden alten Blättern nachgegangen werden.

2. Methode (Fig. 2)

Das Blatt befindet sich in einer dichten, lichtdurchlässigen Küvette, durch welche gleichmässig Aussenluft gesaugt wird. Nach der Küvette wurde der Luft in zwei KOH-Absorptionsrohren das CO_2 entzogen (10% KOH-Lösung). Die Luftbewegung wurde durch eine Membranpumpe aufrechterhalten. Der Blattstiel reichte aus der Küvette während des ersten Tages in die Fütterungslösung, wurde dann gut abgespült und die restlichen 9 Tage in ein mit Brunnenwasser gefülltes Gefäss gesteckt. Dieses Wasser wurde alle 2–3 Tage gewechselt. Nach Ablauf der Versuchsdauer von 10 Tagen wurde das Blatt herausgenommen, gewogen und gezeichnet, getrocknet und weiter verarbeitet. Gefüttert wurde eine Lösung mit markiertem Kaffein (zirka 30–100 γ Kaffein), deren Aktivität pro μl genau bekannt war. Die angebotene Lösung wurde genau gewogen. Nach der Fütterung erfolgte die Bestimmung der Aktivität der nicht aufgenommenen Lösung. Die Differenz zwischen angebotener Aktivität und zurückgewonnener ist gleich der aufgenommenen Kaffeinaktivität. Im zermörserten Trockenmaterial wurde die Aktivität auf Schälchen mit unendlicher Schichtdicke gemessen. (Allgemeines über Radioaktivitätsmessungen vgl. Abschn. III.) Das Wasser wurde auf Aktivität geprüft. Aus der KOH der Absorptionsrohre wurde mit $BaCl_2$ das Karbonat als $BaCO_3$ ausgefällt, mit Wasser ausgewaschen, getrocknet, gewogen und auf Schälchen mit unendlicher Schichtdicke die Aktivität gemessen. Nur im ersten Rohr war radioaktives Karbonat aufzufinden.

3. Bilanzversuch

Versuchsobjekt: 6. Blatt von Sprossspitze, aus der 7. Etage von oben eines mehrjährigen Bäumchens.

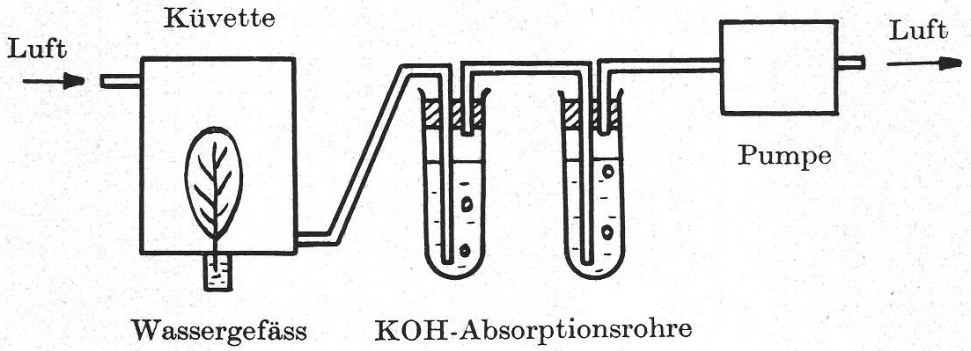
Frischgewicht: 1,48 g, Trockengewicht: 0,46 g, Blattfläche: 66 cm².

Fütterungsdauer: 1 Tag, Versuchsdauer: 10 Tage, Fütterungslösung: C8-markiertes Kaffein.

Ergebnisse:	Angebotene Aktivität	451 000 ipm
	nicht aufgenommene Aktivität	208 000 ipm
	ausgetretene Aktivität in Wasser 2.– 3. Tag	46 000 ipm
	ausgetretene Aktivität in Wasser 4.– 5. Tag	5 700 ipm
	ausgetretene Aktivität in Wasser 6.– 7. Tag	2 750 ipm
	ausgetretene Aktivität in Wasser 8.–10. Tag	2 150 ipm
	Trockenpulver des Blattmaterials	164 000 ipm
	Ba-Karbonat	13 700 ipm
		442 300 ipm

Differenz: 8700 ipm (zirka 2 %). Die Differenz liegt innerhalb der Messfehler.

Weiter wurde das Wasser genauer untersucht. Nach dem Einengen auf ein kleines Volumen wurde chromatographiert, das Kaffein eluiert und die Aktivität des Kaffeins bestimmt. Dabei befand sich praktisch alle Aktivität im Kaffein (90 %).



Figur 2

Versuchsanordnung zur Feststellung der Abgabe von radioaktivem Kohlendioxyd

Diskussion der Ergebnisse

Das wesentlichste Ergebnis dieses Versuches besteht darin, dass das gefütterte *Coffea*-Blatt radioaktives CO_2 abgibt. Es handelt sich dabei um einwandfrei messbare Aktivitäten. Da C8-markiertes Kaffein dem Blatt geboten wurde, folgt daraus, dass der Imidazolring geöffnet wird und dass das C8-Atom über eine noch unbekannte Zahl von Schritten als CO_2 ausgeschieden werden kann. Im weiteren zeigte sich, dass der Hauptteil der Differenz A–P durch aus dem Blattstiel ausdiffundierende Aktivität gebildet wird. Es handelt sich zur Hauptsache um Kaffein. Ob noch geringe Mengen anderer Substanzen dabei austreten, wurde nicht untersucht.

4. *Untersuchung der $^{14}CO_2$-Ausscheidung*

Versuchsanlage siehe Abschnitt 2

a) C8-markiertes Kaffein

Zweig aus der 7. Etage von oben mit 7 Blattpaaren.

Blätter des gleichen Zweiges	Frischgewicht g	Trockengewicht mg	Fläche cm²	Trockenpulver P ipm	Karbonat K ipm
1. Blatt jüngstes	0,90	250	57,5	69 000	0
3. Blatt	0,94	315	51	74 100	760
5. Blatt	1,49	462	72,5	128 500	2 760
6. Blatt ältestes	1,48	456	66	164 000	13 700

b) C2-markiertes Kaffein

Zweig aus der 6. Etage von oben mit 8 Blattpaaren.

Blätter des gleichen Zweiges	Frischgewicht g	Trockengewicht mg	Fläche cm²	Trockenpulver P ipm	Karbonat K ipm
2. Blatt jüngstes	0,72	303	55,5	49 500	810
5. Blatt	1,10	402	60,3	42 500	875
6. Blatt	1,05	453	60,5	67 000	3 040
7. Blatt ältestes	1,43	486	70,5	51 900	2 800

c) N7-Methyl-markiertes Kaffein

Blatt Etage von oben Blatt von Sprossspitze	Frischgewicht g	Trockengewicht mg	Fläche cm²	Trockenpulver P ipm	Karbonat K ipm
8. Etage, 7. Blatt	0,67	331	45	33 000	2 100
10. Etage, 7. Blatt	0,87	325	46	48 100	1 500

Diskussion

Die Aktivität im Trockenpulver nach dem Versuch wurde als Massstab der Kaffeinaufnahme dem ausgeschiedenen, radioaktiven Karbonat gegenübergestellt. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass junge Blätter verhältnismässig wenig aktives CO_2 ausscheiden und dass die Ausscheidungen bei älteren Blättern die höchsten Werte besitzen. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit jenen des Abschnittes III. In den alten Blättern wird ein grösserer Teil des radioaktiven Kaffeins abgebaut.

Nicht nur das C8-Atom (Abschn. IV, 3), auch das C2-Atom und das C-Atom der N7-Methylgruppe des Kaffeins wurden durch den Blattstoffwechsel über eine Anzahl von Schritten oxydiert und als CO_2 abgegeben. Das Kaffein kann also durch das Blatt vollständig abgebaut werden. Als einfachstes und erstes Abbauprodukt wurde CO_2 isoliert. Gestützt auf diese Ergebnisse erschien es hoffnungsvoll, nach weiteren Abbauprodukten, die zwischen dem Kaffein und dem CO_2 liegen, zu suchen.

V. Untersuchung der Abbauprodukte des Kaffeins

1. Literaturübersicht

Über die Abbauprodukte der methylierten Xanthine in den Pflanzen liegen bis heute keine Mitteilungen vor. Beim Menschen und bei den Tieren wurden Untersuchungen auf diesem Gebiete bereits Ende des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Bondzynski (1895) fütterte Kaffein und Theobromin an Menschen, Hunden und Kaninchen. Er isolierte im Harn Verbindungen, die er auf Grund ihrer Eigenschaften und vor allem der Elementaranalyse als Methylxanthine erkannte. Krueger und Schmidt (1900) und Krueger (1900) gelangten nach eingehenden Studien mit den gleichen Versuchsobjekten zu folgenden Ergebnissen: Der Hund scheidet nach Kaffeinfütterung mehr 3-Methylxanthin und weniger 7-Methylxanthin aus, wogegen Menschen und Kaninchen mehr 7-Methylxanthin und 1-Methylxanthin, aber wenig 3-Methylxanthin abgeben. Die Identifikation der Verbindungen erfolgte auf Grund der Löslichkeit der Salze der Methylxanthine und ihrer mikroskopischen Kristallstrukturen. Sie interpretieren ihre Ergebnisse so, dass der tierische Körper fähig sei, das Kaffein (Trimethylxanthin) zu demethylieren und über Dimethylin Monomethylxanthine überzuführen. Auch bei der Fütterung von Dimethylxanthin gelang es, Monomethylxanthin nachzuweisen. Myers und Wardell (1928) fragten sich, ob bei Fütterung von Kaffein eine Zunahme der Harnsäure im Urin zu beobachten sei. Als Bestimmungsmethode für Harnsäure verwendeten sie die kolorimetrische Methode von Benedikt und Franke (1922). Es gelang ihnen, eine Zunahme der Färbung nach der Fütterung von Kaffein und Theophyllin nachzuweisen. Theobromin gab keinen Zuwachs der Färbung. Weiter zeigten sie, dass neben der Harnsäure auch 1-Methylharnsäure und 1,3-Dimethylharnsäure eine Farbreaktion mit dem Benedikt-Franke-Reagens zeigen. 7-Methylharnsäure zeigt keine Reaktion. Sie schlossen aus ihren Versuchen, dass ein beachtlicher Teil des Kaffeins und des Theophyllins in Stellung 8 oxydiert und demethyliert werde. Dass bei Theobrominfütterung die Färbung nicht zunahm, führten sie darauf zurück, dass das 7-Methylxanthin keine Farbreaktion gibt. Buchanan, Block und Christman (1945) stellten sich die Aufgabe, zu untersuchen, wieweit die Farbzunahme nach Kaffein- und Theophyllinfütterung auf eine Bildung von Harnsäure und wieweit auf methylierte Derivate derselben zurückzuführen sei. Sie lösten dieses Problem unter Verwendung des Fermentes Uricase, welches nur Harnsäure, nicht aber die Methylderivate merklich spaltet. Es gelang ihnen so zu zeigen, dass die Farbzunahme mit der Zunahme der Methylderivate in Zusammenhang steht. Der Harnsäuregehalt änderte sich nicht so stark. Myers und Hanzal (1946) fütterten methylierte Harnsäure an Ratten und Hunde. Die Umwandlung von höher methylierten Derivaten der Harnsäure zu niedriger methylierten ist mit einer Zunahme der Bene-

dikt-Franke-Färbung verbunden. Über Färbungsbilanzversuche gelang es nachzuweisen, dass beim Dalmatiner Hund nach Fütterung von 1,3-Dimethyl- oder 3-Methylharnsäure die Gesamtfärbung zunahm. (Färbung, berechnet auf Grund der gefütterten Verbindung, verglichen mit der Färbung im ausgeschiedenen Urin.) Diese Beobachtung wurde so erklärt: Die beiden Verbindungen sind demethyliert worden, die 1,3-Dimethylharnsäure zur 1-Methylharnsäure und die 3-Methylharnsäure zur Harnsäure, beide Schritte bringen eine Zunahme der Gesamtfärbung. Es wurde hier zum ersten Male auf eine Verbindung im Stoffwechsel zwischen einer Methylharnsäure und der Harnsäure hingewiesen. Brodie, Axelrod und Reichenthal (1952) fütterten Theophyllin an Menschen, und es gelang ihnen, aus dem Urin kristallisierte 1,3-Dimethylharnsäure zu isolieren und durch UV- und IR-Spektren zu charakterisieren. Johnson (1952) fällte die Purine durch ammoniakalisches Silber und fraktionierte an einer Ionentauschersäule. Die Säule gab die Harnsäurederivate vor den Xanthinderivaten frei. Er stellte nach der Kaffeinfütterung mehrere Xanthinderivate fest. Unter normalen Bedingungen (keine Fütterung von Methylxanthinen) zeigte sich nur eine Fraktion, nämlich Harnsäure, im menschlichen Urin. Bei Verabreichung von Kaffein an Menschen zeigten sich zwei weitere Fraktionen, die Johnson als 7-Methylharnsäure (evtl. auch 1-Methylharnsäure) und 1,7-Dimethylharnsäure identifizierte. Er stützte seine Ergebnisse mit papierchromatographischen und UV-spektroskopischen Untersuchungen. Bei der Fütterung von Theophyllin zeigte sich neben der Harnsäure eine zusätzliche Fraktion (1-Methylharnsäure). Johnson bestreitet, dass eine bestimmte Reihenfolge der Demethylierung zu beobachten sei. Weinfeld und Christman (1953) zeigten mit der Benedikt-Franke-Farbreaktion und der Uricasemethode, dass der Mensch nach Kaffeinfütterung 1-Methylharnsäure ausscheidet, 3-Methylharnsäure konnten sie nicht feststellen, ebenso nur wenig 1,3-Dimethylharnsäure. Bei Theophyllinfütterung scheiden Menschen, Kaninchen und Ratten 1-Methyl- und 1,3-Dimethylharnsäure aus. 7-Methylharnsäure wurde bei diesem Vorgehen nicht erfasst. Von Interesse ist auch eine Arbeit von Dikstein, Bergmann und Chaimovitz (1956), in welcher ein Verfahren zur Trennung methylierter Xanthin- und Harnsäurederivate mittels stark saurer Ionentauscher vorgeschlagen wird. Die Identifikation innerhalb der Xanthin- bzw. Harnsäurederivate erfolgte durch zweidimensionale Papierchromatographie. Die Flecken wurden mittels Besprühens sichtbar gemacht. Zu erwähnen ist auch ein Hinweis in der bekannten Arbeit von Weevers (1930) auf eine Veröffentlichung von Albanese (1903). Dieser stellte fest, dass Kaffein in den bekannten Genussmitteln, wie Kaffee, Tee, Kola usw., immer auch von 3-Methylxanthin begleitet wird. Er betrachtete 3-Methylxanthin als Vorstufe bei der Kaffeinbiosynthese.

Der bestbekannte aerobe Purinabbau führt über Harnsäure, Allantoin, Allantoinsäure zu Harnstoff und Glyoxylsäure. Fosse et al. (1929a) stellten fest, dass Erbsen und Bohnensamen die Fähigkeit besitzen, Harnsäure zu Allantoin abzubauen. Später erkannten Fosse et al. (1930b), dass die Uricase von *Soja hispida* durch Cyanid hemmbar ist. Die Entdeckung von Harnsäure in *Melilotus officinalis* erfolgte durch Fosse et al. (1932a, b). Sie stellten fest, dass *Melilotus off.* und *Glycina soja* 0,03 bis 0,25 g/kg enthalten. Weiter wiesen sie darauf hin, dass Harnsäure als Vorläufer von Allantoin und Allantoinsäure in Frage kommt. Eine Übersicht der Ergebnisse der quantitativen Harnsäurebestimmungen in Pflanzen verschiedener Familien und der qualitativen Feststellung von Uricase findet man in der Arbeit von Fosse et al. (1933). Der Mechanismus der Uricasereaktion ist relativ kompliziert. Biltz und Max (1921) untersuchten den oxydativen chemischen Abbau der Harnsäure. Je nach pH-Wert stellte er hauptsächlich Allantoin oder Uroxansäure fest. Klemperer (1945) führte In-vitro-Versuche mit Uricasepräparaten durch. Es gelang ihm, zu zeigen, dass je nach pH-Wert und Pufferlösung verschieden hohe Allantoinausbeuten feststellbar waren. Er stellte die Hypothese auf, dass aus Harnsäure ein unstabiles Zwischenprodukt gebildet wird, welches in HDC (Hydroxyacethylendiureidocarbonsäure), Uroxansäure und Allantoin zerfallen kann. Der Anteil dieser drei Verbindungen ist puffer- und pH-abhängig. Brown, Roll und Cavallieri (1947) fütterten Ratten mit ^{15}N-markierter Harnsäure (^{15}N in Pos. 1). Sie zeigten, dass das gebildete Allantoin im Hydantoin- und im Harnstoffteil gleichmässig markiert war. Sie erklärten ihre Ergebnisse so, dass von der Harnsäure zum Allantoin ein symmetrisches Zwischenprodukt durchlaufen wird. Praetorius (1948) untersuchte in vitro die Uricasewirkung spektroskopisch. Er wies zwei unstabile Zwischenprodukte nach, die er zwischen die Harnsäure und das Allantoin stellte. Bentley und Neuberger (1952) überlegten sich mögliche Mechanismen für den Abbau und schlugen Strukturen für die von Praetorius gefundenen unstabilen Zwischenprodukte vor. Als einzigen enzymatischen Schritt betrachteten sie die Oxydation des Harnsäuremonoanions zum ersten unstabilen Zwischenprodukt. Die weiteren Schritte verlaufen nach ihrer Ansicht spontan in Richtung höherer Stabilität. Canellakis, Tuttle und Cohen (1955) oxydierten Harnsäure mit verschiedenen Peroxydasen und untersuchten die Abbauprodukte, unter denen je nach Peroxydase verschieden grosse Mengen von Allantoin aufzufinden waren.

Die systematische Bearbeitung des Allantoins in den Pflanzen stammt aus der Schule von Fosse. Fosse und Bossuyt (1929) arbeiteten ein quantitatives Analysenverfahren zur Bestimmung von Allantoin aus. Das Allantoin wird zuerst basisch zur Allantoinsäure hydrolysiert und diese sauer zu 2 Molekülen Harnstoff und Glyoxylsäure gespalten. Harn-

stoff lässt sich durch Xanthydrol fällen und gravimetrisch bestimmen. Inkubierte man eine gepufferte Allantoinlösung mit feinem Sojamehl, so zeigte sich, dass Allantoin zu Allantoinsäure abgebaut wurde (Fosse, 1929b). Der Nachweis des Fermentes (Allantoinase), das diese Reaktion katalysiert, gelang in vielen Pflanzen (Fosse et al., 1930a). In einer Arbeit von Fosse et al. (1933) findet man eine Übersicht, die Ergebnisse von quantitativen Allantoinbestimmungen in Pflanzen von verschiedenen Familien gibt. Das Allantoin ist im Pflanzenreich weit verbreitet. In der gleichen Arbeit sind auch Angaben über das Vorkommen der Allantoinase zu finden. Eine nähere Betrachtung des Allantoinmoleküls durch Fosse et al. (1934a) wies auf 3 tautomere Strukturen hin, von denen eine symmetrisch bezüglich der Ureido-Kohlenstoff-Atome ist und eine andere ein asymmetrisches C-Atom aufweist. Es gelang Fosse et al. (1934b), optisch aktives Allantoin aus *Platanus orientalis* zu isolieren. Echevain et al. (1940) wiesen auf den sehr hohen Gehalt an Allantoin von panaschierten Blättern des *Acer negundo* hin. Sie äusserten die Ansicht, dass bei dieser Pflanze nicht alles Allantoin aus dem Harnsäureabbau stammen könne. Sie suchten nach Verbindungen zum Proteinstoffwechsel. Das gleiche Problem wurde von Mothes und seiner Schule in neuerer Zeit bearbeitet. Mothes (1958) gibt ein zusammenfassendes Bild über die Stellung der Ureide im Pflanzenreich. Es wurden mehrere Pflanzen gefunden (Zusammenfassung Reinbothe, 1961a), die verhältnismässig hohe Mengen an Allantoin oder Allantoinsäure enthalten. Diese beiden Verbindungen konnten auf Grund von Untersuchungen des Blutungssaftes als N-Speicher- und N-Transportformen identifiziert werden. Die nahe Verbindung des Allantoins und der Allantoinsäure in den Allantoin- und Allantoinsäurepflanzen zum Eiweissstoffwechsel ist sehr wahrscheinlich. Es wurde bezweifelt, dass die bedeutenden Mengen dieser Verbindungen nur aus dem Nukleinsäureabbau entstammen. Reinbothe (1961a, b) weist auf die Möglichkeit hin, dass Allantoin aus Aminosäuren (z. B. Glyzin) über eine Purinsynthese mit anschliessendem Abbau gebildet werden kann.

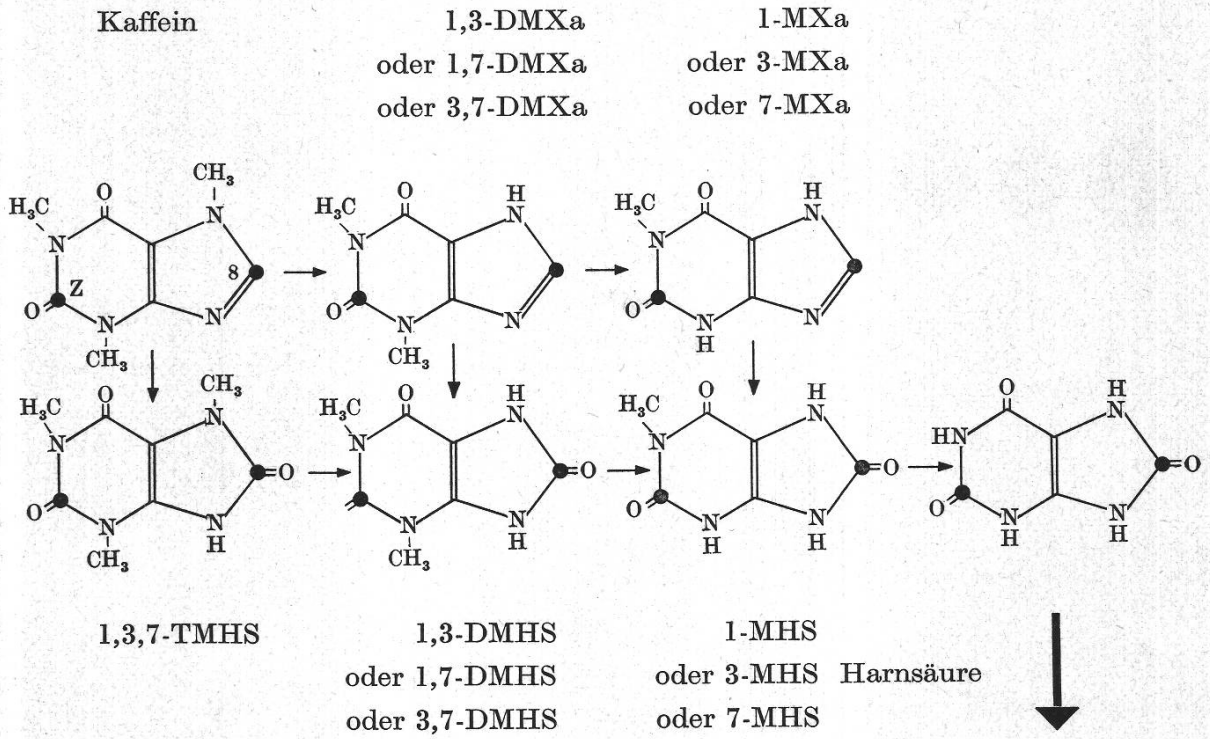
Es war Fosse (1926a), der als erster Allantoinsäure in Pflanzen durch Xanthydrolfällung nachwies. Die Allantoinsäure ist sehr empfindlich und zerfällt beim Erwärmen in schwachen Mineralsäuren sehr rasch in Harnstoff und Glyoxylsäure. Fosse (1926b) wählte deshalb ein schonendes Extraktionsverfahren, er arbeitete bei tiefen Temperaturen und ohne Mineralsäuren. Es gelang ihm, in *Acer pseudoplatanus* und *Phaseolus vulgaris* Allantoinsäure durch die Xanthydrolfällung nachzuweisen. Die Arbeit von Fosse et al. (1933) enthält eine Tabelle, in der für Pflanzen verschiedener Familien der Allantoinsäuregehalt angegeben ist. Die Allantoinsäure ist im Pflanzenreich ebenfalls weit verbreitet. Über Beziehungen zwischen dem Eiweissstoffwechsel und der Allantoinsäure in den

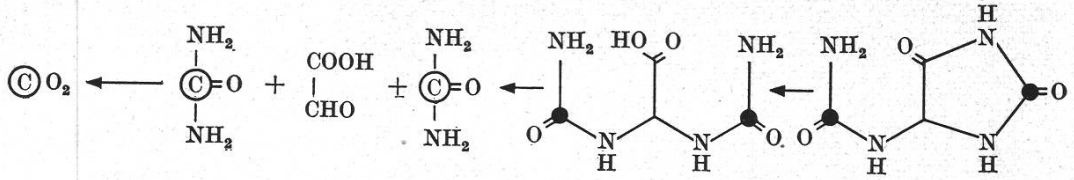
Allantoinsäurepflanzen vergleiche man die zusammenfassende Arbeit von Mothes (1958). Über das Vorkommen bei höheren Pflanzen und den Nachweis des Fermentes Allantoikase, welches Allantoinsäure zu Harnstoff und Glyoxylsäure spaltet und aus diesen Verbindungen wieder Allantoinsäure aufbauen soll, liegt eine Arbeit von Brunel-Capelle (1950) vor. Da die Allantoinsäure sehr leicht hydrolysierbar ist, war es notwendig, zu untersuchen, ob die Spaltung enzymatisch oder nichtenzymatisch verläuft. Die Untersuchung erfolgte so, dass das zerkleinerte Gewebe, welches man mit Allantoinsäure inkubierte, vorher gekocht wurde. Es zeigte sich in einzelnen Fällen ein enzymatischer Abbau, in anderen nicht.

Zum Vorkommen von Harnstoff bemerkt Tracey (1955) mit Recht, dass der Nachweis signifikanter Mengen so lange fraglich ist, wie nicht die leichte Hydrolisierbarkeit der Allantoinsäure berücksichtigt wird. Die Erwärmung von pflanzlichen Extrakten mit schwachen Säuren genügt zur Freisetzung von Harnstoff aus Allantoinsäure. Im weitern ist festzuhalten, dass die Urease im Pflanzenreich weit verbreitet und sehr aktiv ist und einer Akkumulation von Harnstoff entgegenwirkt.

2. *Arbeitshypothese*

Es soll folgender Abbauweg für das Kaffein angenommen und experimentell geprüft werden:





Harnstoff
Glyoxylsäure

Allantoinsäure

Allantoin

DMXa	Dimethylxanthin	DMHS	Dimethylharnsäure
MXa	Methylxanthin	MHS	Methylharnsäure
TMHS	Trimethylharnsäure		

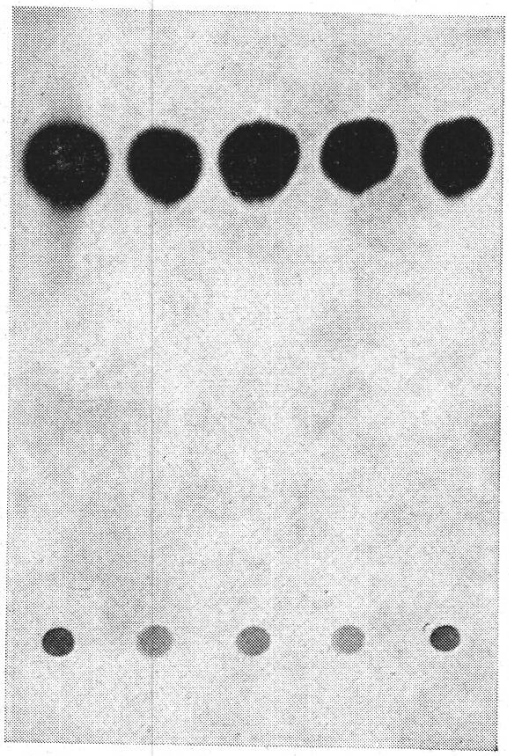
Mit markierten Methylgruppen soll untersucht werden, ob der Kohlenstoff als C1-Fragment in verschiedene Aminosäuren, die dem C1-Stoffwechsel nahestehen, gelangt.

3. *Versuche*

Bei den Versuchen wurde darauf geachtet, verschiedene Fütterungs- und Extraktionsmethoden anzuwenden.

a) Untersuchung der Kaffein-Fütterungslösung

Da bei den Fütterungen nicht steril gearbeitet werden konnte, musste zuerst festgestellt werden, ob in der Kaffeinlösung während der Fütterungszeit von 2 Tagen ein Abbau durch Mikroorganismen zu beobachten sei. Zu diesem Zwecke wurde ein Fütterungsgläschen mit radioaktiver



Figur 3

Fütterungslösung (Erklärungen siehe Text)

1. Bahn von links: vor dem Versuch
2. und 3. Bahn von links: 1. Tag
4. und 5. Bahn von links: 2. Tag

Kaffeinlösung (1 mg/0,3 ml) ohne Blatt 2 Tage unter gleichen Bedingungen wie bei der Fütterung gehalten. Bei Versuchsbeginn wurde eine Probe chromatographiert, ebenso am 1. Tage zwei und nach 2 Tagen weitere zwei Proben. Einzelheiten über Chromatographie und Radiographie sind im folgenden Abschnitt b zu finden.

Laufmittel: BAW absteigend auf Whatman 1. Das Ergebnis zeigt Figur 3 (Radiographie).

Die Radiographie weist auf die radioaktive Reinheit des Kaffeins hin und zeigt keine Hinweise auf einen mikrobiellen Abbau während der Fütterungsdauer. Gleiche Ergebnisse zeigten sich, wenn eine verdünnte Kaffeinlösung (5 mg/l) für 10 Tage in Bechergläser an der Fütterungsstelle aufgestellt wurde. Es gelang nicht, durch UV-Messungen der Kaffeinabsorption (272 mμ) einen Abbau festzustellen.

b) Versuch A: Fütterung isolierter Blätter

Als Versuchsobjekte dienten 2 gegenüberstehende Blätter (5. Paar von der Sprossspitze eines Zweiges der 9. Etage von oben) eines mehrjährigen Kaffeebaumes. Die Blätter wurden vom Zweig weggeschnitten und mit dem Blattstiel in kleine Fütterungsgefässe gesteckt. In den Gefässen befand sich eine Lösung von C2- bzw. C8-markiertem Kaffein (1 mg radioaktives Kaffein/0,3 ml Wasser). Die Fütterung, die neben den Kaffeebäumen im gleichen Raume erfolgte, dauerte 2 Tage. Nachher tauchten wir die Stiele der Blätter für 8 Tage in Bechergläser mit Brunnenwasser ein. Nach dieser Versuchszeit, welche die Blätter ohne Schaden überstanden, erfolgte die Bestimmung von Frischgewicht und Fläche. Darauf wurden die Blätter bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet und gewogen.

Blatt	Frischgewicht g	Trockengewicht mg	Fläche cm²
C2	1,23	446	71,4
C8	1,16	424	63,5

Zur Extraktion wurden die Blätter zermörsert, mit 80 % Äthanol übergossen und dieses 30 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach dem Abfiltrieren der festen Bestandteile erfolgte das Einengen des Äthanolextraktes auf ungefähr 3–5 ml am Rotationsverdampfer bei 30–40 °C. Die noch ausgefallenen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Ein kleiner Teil dieser Extrakte wurde mit Lösungen, in denen sich vermutete Abbauprodukte befanden, gemischt.

1. Ansatz: Extrakt, Harnsäure, 1-Methyl-, 3-Methyl-, 7-Methyl-, 1,7-Dimethyl-, 3,7-Dimethyl-, 1,3,7-Trimethylharnsäure.

Die Lösung ist alkalisch, damit die Harnsäure und deren Monomethylderivate nicht ausfallen.

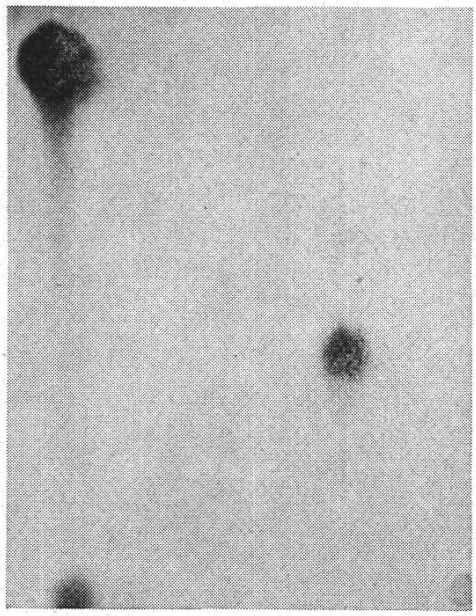
2. Ansatz: Extrakt, Allantoin, Allantoinsäure und Harnstoff.
Ureide Die Lösung ist neutral.

Die beiden Ansätze wurden für jeden Extrakt separat gemischt, vor allem deshalb, weil im 1. Ansatz eine alkalische Lösung vorliegt, in welcher Allantoin zu Allantoinsäure hydrolysiert werden könnte. Der 2. Ansatz erlaubte festzustellen, ob Allantoinsäure im Extrakt vorkommt. Die Ansätze wurden auf Whatman-1-Papier zweidimensional chromatographiert.

1. Laufrichtung: aufsteigend: BAW-Laufmittel
n-Butanol : Eisessig : Wasser 4 : 1 : 1

2. Laufrichtung: absteigend: AAW-Laufmittel
Äthanol : Eisessig : Wasser 81 : 5 : 14
(Dikstein et al., 1956)

Die sorgfältig getrockneten Chromatogramme wurden auf Röntgenpapier «Agfa» gelegt, zwischen 2 Glasplatten gepresst und das Röntgenpapier während 2–3 Monaten exponiert. Nach dieser Zeit erfolgte die photographische Entwicklung der Radiographien und die Besprühung der Chromatogramme zur Sichtbarmachung der co-chromatographierten Verbindungen. Zur Lokalisation der Harnsäuren fand neben der Untersuchung im UV-Licht ein Quecksilberreagens Verwendung (Dikstein et al., 1956). Die Ureidchromatogramme wurden mit Ehrlichs-Reagens (p-Dimethylaminobenzaldehyd in verd. HCl) besprüht. Der Vergleich der Flecken, welche die radioaktiven Substanzen auf dem Röntgenpapier



Figur 4

Versuch A (Erklärungen siehe Text)

zurückliessen, mit den Flecken der entsprechenden besprühten Chromatogramme, die von den co-chromatographierten Verbindungen stammten, ermöglichte das Auffinden von radioaktiven Abbauprodukten.

Radiographie: Figur 4, C8-markiert, Ansatz 2: Ureide.

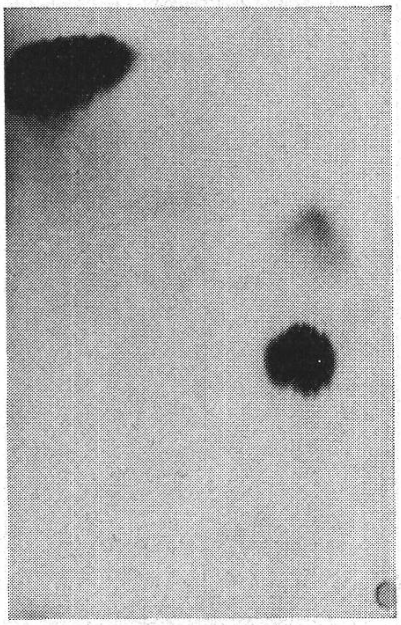
c) Versuch B: Fütterung isolierter Blätter

Versuchsobjekte: C2-Versuch: 4. Blatt von Sprossspitze, 7. Etage von oben; C8-Versuch: 5. Blatt von Sprossspitze, 7. Etage von oben eines mehrjährigen Baumes. Die Fütterung und die Trocknung erfolgten wie bei Versuch A. Fütterungsdauer 2 Tage, im Wasser 8 Tage.

Blatt	Frisch-gewicht g	Trocken-gewicht mg	Fläche cm^2
C2-markiert	1,19	350	55
C8-markiert	0,94	340	50,5

Zur Extraktion wurden die Blätter zermörsert und mit 20 ml H_2O und 5 ml 0,05n H_2SO_4 eine halbe Stunde bei leichtem Kochen extrahiert. Nach dem Abfiltrieren der festen Bestandteile erfolgte das Einengen des Extraktes auf zirka 3–5 ml am Rotationsverdampfer bei 30–40 °C. Die noch ausgefallenen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert. Im weitern war das Vorgehen gleich wie beim Versuch A, mit der Ausnahme, dass nur der Harnsäureansatz chromatographiert wurde.

Radiographie: Figur 5, C2-markiert, Ansatz 1: Harnsäuren.



Figur 5

Versuch B (Erklärungen siehe Text)

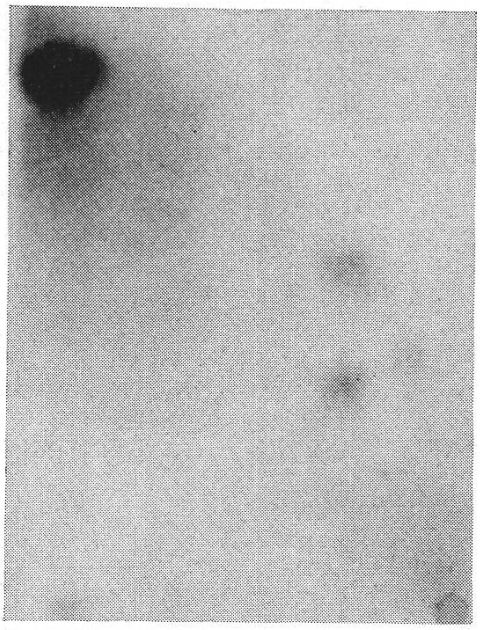
d) Versuch C: Fütterung isolierter Blätter

Versuchsobjekte: Die zwei Blätter eines Blattpaares (5. von Sprossspitze), in der 10. Etage von oben, eines mehrjährigen Baumes. Die Fütterung erfolgte wie bei Versuch A. Fütterungsdauer 1 Tag, Wasser 9 Tage. Nach der Fütterung wurden Frischgewicht und Fläche der Blätter gemessen.

Blatt	Frischgewicht g	Fläche cm²
C2-markiert	0,86	49
C8-markiert	0,98	57

Vor der Extraktion mit 80% Äthanol während 30 Minuten wurden die Blätter mittels flüssiger Luft gefroren und im Mörser zerrieben. Alles weitere erfolgte gleich wie bei Versuch A.

Radiographie: Figur 6, C2-markiert, Ansatz 1: Harnsäuren.



Figur 6

Versuch C (Erklärungen siehe Text)

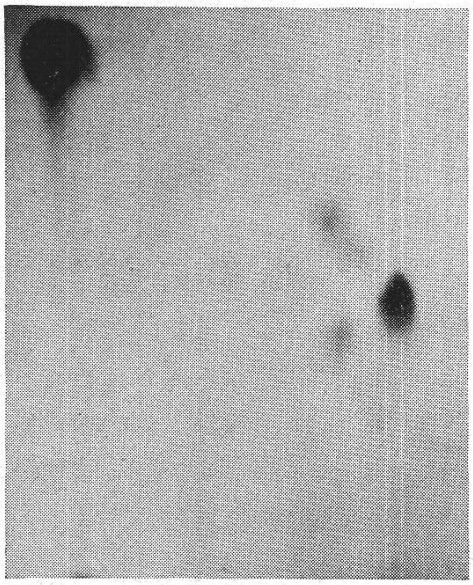
e) Versuch D: Fütterung von Blättern am Baume

Versuchsobjekte: C2-Versuch: 7. Blatt von Sprossspitze, 8. Etage von oben. C8-Versuch: 5. Blatt von Sprossspitze, 8. Etage von oben eines mehrjährigen Baumes. Die Fütterung erfolgte durch eine Blattzunge, welche die Mittelrippe enthielt, aus einem Röhrchen (Fig. 8). Die ausgeschnittene Blattzunge tauchte man in die radioaktive Kaffeinlösung (1 mg/0,3 ml). Die Fütterung dauerte 2 Tage, nachher wurde das Röhrchen entfernt, und das Blatt blieb weitere 8 Tage am Baume. Nach der Versuchszeit wurden die Blätter von der Pflanze entfernt, gewogen und die Fläche gemessen.

Blatt	Frisch-gewicht g	Fläche cm²
C2-markiert	1,30	65
C8-markiert	1,28	63

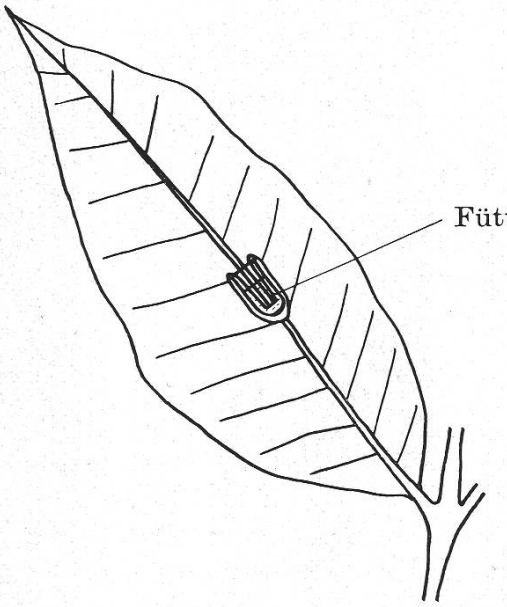
Vor der Extraktion mit 80 % Äthanol während 30 Minuten wurden die Blätter mittels flüssiger Luft gefroren und im Mörser zerrieben. Alles weitere erfolgte gleich wie bei Versuch A.

Radiographie: Figur 7, C8-markiert, Ansatz: Ureide.



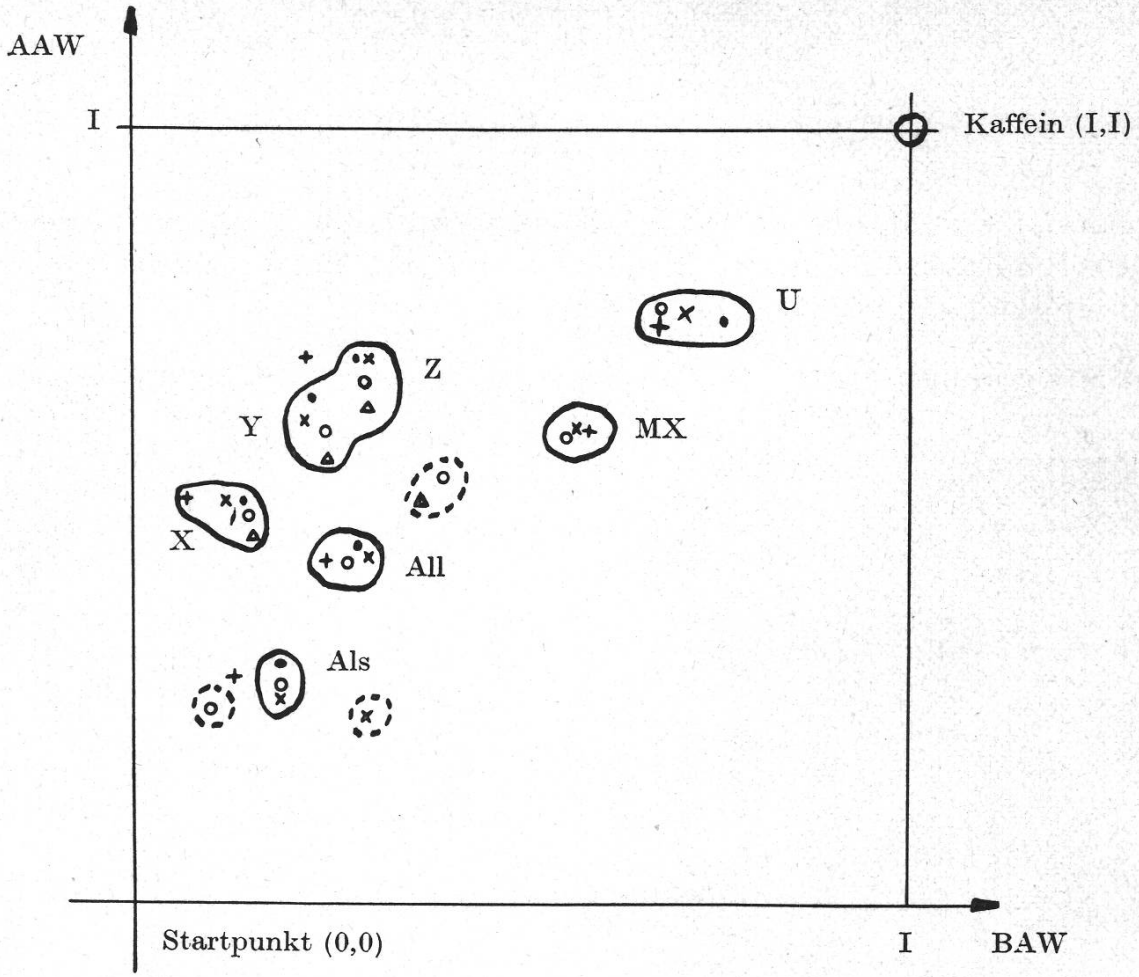
Figur 7

Versuch D (Erklärungen siehe Text)



Figur 8

Fütterung von Blättern am Baum durch eine Zunge der Mittelrippe



Figur 9

Zusammenfassung der Radiographien

×	Versuch A: C2-markiert, Ureide
+	Versuch B: C2-markiert, Harnsäuren
•	Versuch C: C2-markiert, Ureide
○	Versuch D: C8-markiert, Ureide
△	Versuch N7-Methyl-markiert
All	Allantoin
Als	Allantoinsäure
U	Harnstoff
MX	Monomethylxanthin (3– oder 7–)
X, Y, Z	unbekannte Substanzen

4. *Diskussion*

a) Zusammenfassende Darstellung der Radiographien

Figur 9 fasst die Resultate der einzelnen Radiographien zusammen. Es wurden die Schwärzungszentren der radioaktiven Flecken auf den Röntgenpapieren ausgemessen und in einem Koordinatensystem dargestellt, wobei dem Startflecken die Koordinaten (0,0) und dem Kaffein (1,1) zugeordnet wurden. Es zeigten sich keine wesentlichen Verschiedenheiten zwischen

der Fütterung mit C2-markiertem und der mit C8-markiertem Kaffein. Die vorhandenen Flecken sind die gleichen und besitzen sowohl bei der einen wie auch bei der anderen Markierung gleiche Lage im Koordinatensystem.

b) Identifikation der Verbindungen

Ureidansätze

Durch Vergleiche von Radiographien und Papierchromatogrammen, auf denen neutrale Ureidansätze aufgetragen wurden, gelang es, Radioaktivität im Allantoin, in der Allantoinsäure und im Harnstoff nachzuweisen (vgl. Fig. 9). Beim Harnstoff liegt der Verdacht nahe, dass er durch Hydrolyse bei der Extraktion und Chromatographie aus der Allantoinsäure entstanden ist. Darauf weisen die langgestreckten Harnstofflecken hin (Hydrolyse durch saures Laufmittel). Anderseits liegen keine Beweise dafür vor, dass Harnstoff in den lebenden *Coffea*-Blättern nicht vorkommt.

Ein Vergleich der Schwärzungsintensitäten der Flecken bei den verschiedenen Versuchen zeigt folgende Ergebnisse: Beim Versuch A ist neben dem gefütterten Kaffein vor allem das Allantoin sehr stark aktiv. Allantoinsäure und Harnstoff sind feststellbar, aber nur ganz schwach aktiv. Etwas stärker aktiv sind noch die unbekannten Verbindungen X, Y, Z. MX ist ebenfalls nur schwach aktiv. Beim Versuch B wurden keine Ureidansätze chromatographiert, da bei der sauren, wässrigen Extraktion die Allantoinsäure hydrolysiert wird. Beim Versuch C besitzt auch wieder neben dem Kaffein das Allantoin eine starke Aktivität. Sie ist aber nicht ganz so ausgeprägt wie bei A. Die unbekannten Substanzen X, Y, Z kommen ihr ungefähr gleich. Allantoinsäure und Harnstoff sind schwach aktiv, aber gut feststellbar. MX zeigt ebenfalls schwache, feststellbare Aktivität. Im Versuch D ist neben dem gefütterten Kaffein die unbekannte Verbindung X am stärksten aktiv. Allantoin, Y und Z sind ebenfalls stark aktiv. Harnstoff, Allantoinsäure und MX sind schwächer aktiv, aber gut feststellbar. Neben den erwähnten Verbindungen, die bei allen Fütterungen vorkommen, zeigen sich bei einzelnen Fütterungen noch weitere unbekannte Substanzen (vgl. Fig. 9).

Harnsäureansätze

Ein sehr geringer Unterschied zwischen den Ansätzen mit den Harnsäuren, die leicht alkalisch sind, und den neutralen Ureidansätzen besteht darin, dass beim alkalischen Ansatz etwas mehr Allantoinsäure und Harnstoff vorzufinden sind. Allantoin kann in der alkalischen Lösung zu Allantoinsäure hydrolysiert und diese im sauren Laufmittel zu Harnstoff abgebaut werden. Man kann den Allantoinsäureabbau zu Harnstoff an

den verhältnismässig langen Schwänzen der Harnstofflecken erkennen. Der Unterschied im Allantoinsäuregehalt zwischen den beiden Ansätzen war im allgemeinen so gering, dass man ihn nicht mit Sicherheit feststellen konnte.

Keiner der radioaktiven Flecken fiel mit einem Harnsäureflecken auf den Papierchromatogrammen zusammen. Es gelang nicht, in der Harnsäure oder in einem ihrer methylierten Derivate Radioaktivität nachzuweisen. 3-Methylharnsäure fällt in den Chromatogrammen mit dem stark aktiven Allantoin zusammen. In den Versuchen im folgenden Abschnitt 5 gelang es nicht, unter dem Allantoin merkliche Mengen radioaktive 3-Methylharnsäure aufzufinden.

5. *Untersuchung des Allantoins*

Der Zweck dieser Untersuchungen bestand darin:

1. einen weiteren Beweis für die Anwesenheit des Allantoins zu geben;
2. die Aktivität im Allantoin zu lokalisieren (Harnstoff- oder Glyoxylsäureteil).

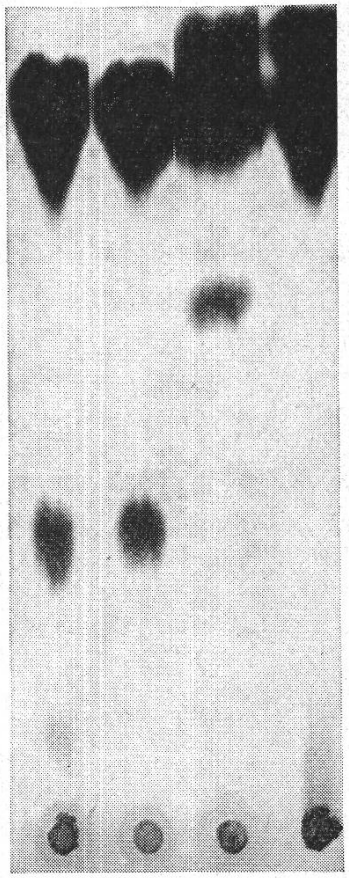
a) Versuchsanordnung

Methode vergleiche Fosse und Bossuyt (1929)

1. Eine bestimmte Menge Rohextrakt wurde ohne jede Behandlung nach Zugabe von wenig Allantoin, Allantoinsäure und Harnstoff auf einem Chromatogramm aufgetragen (Fig. 10, 2. Bahn von links).
2. Eine gleiche Menge Rohextrakt wie bei 1. wurde nach Zugabe von wenig Harnstofflösung auf pH 6–7 gepuffert und mit Urease während 2 Stunden inkubiert. Der Extrakt wurde ebenfalls aufgetragen (Fig. 10, 1. Bahn von links).
3. Eine doppelte Menge Rohextrakt wie bei 1. wurde in einem kleinen Reagenzglas zusammen mit einer kleinen Menge Allantoin nach Zugabe von einigen Tropfen ln KOH für 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt (Hydrolyse des Allantoins zur Allantoinsäure). Darauf wurde der Extrakt mit ln HCl angesäuert und während 5 Minuten wieder im siedenden Wasserbad erhitzt (Hydrolyse der Allantoinsäure zum Harnstoff). Die Hälfte des Extraktes wurde wieder aufgetragen (Fig. 10, 3. Bahn von links). Die andere Hälfte wurde auf pH 6–7 gepuffert und mit Urease während 2 Stunden inkubiert (Harnstoff$\rightarrow CO_2$ und NH_3). Der Extrakt wurde ebenfalls aufgetragen (Fig. 10, 4. Bahn von links).

Die 4 Flecken auf Whatman-1-Papier wurden im AAW-Laufmittel nebeneinander chromatographiert. Das Chromatogramm wurde ge-

trocknet und nach der bekannten Art (Abschn. 3) eine Radiographie hergestellt und die Chromatogramme besprüht. Der Rohextrakt für den Versuch in Figur 10 stammt vom Versuch A (Abschn. 3) mit C2-markiertem Kaffein.



Figur 10

Allantoinuntersuchung (Erklärungen siehe Text)

b) Ergebnisse

Durch die alkalische Hydrolyse wird Allantoin in Allantoinsäure übergeführt, und die anschliessende saure Hydrolyse spaltet diese zu Harnstoff und Glyoxylsäure. In der 2. Bahn von links Figur 10 erkennt man den stark aktiven Allantoinflecken im unbehandelten Rohextrakt. Nach der Hydrolyse verschwindet dieser Flecken, und die Aktivität ist im Harnstoff (3. Bahn von links) wiederzufinden. Es gelang nicht, das Vorhandensein von 3-Methylharnsäure, die auf dem Chromatogramm ungefähr mit dem Allantoin zusammenfällt, festzustellen. Wird nun der hydrolysierte Extrakt, der die Allantoinaktivität im Harnstoff enthält, mit Urease inkubiert, so verschwindet der Harnstofflecken, der aktive Kohlenstoff geht als CO_2 weg. Dieser Versuch beweist noch zwingender das Auftreten von Allantoin im Blattextrakt. Er zeigt auch, dass im

Allantoin die Aktivität in den beiden Harnstoffteilen und nicht im Glyoxylteil lokalisiert vorliegt. Mit C2- und C8-markiertem Kaffein erhält man die genau gleichen Ergebnisse, ebenso bei den Versuchen C und D.

6. Untersuchungen zum Methylxanthin

Im Abschnitt V 4b wurde vermutet, dass ein Schwärzungsflecken auf den Radiographien auf aktives 3-Methylxanthin hinweise. Nähere Untersuchungen sollen Einblick in diese Frage geben.

Das 7-Methylxanthin ist dem 3-Methylxanthin chromatographisch so ähnlich, dass keine Unterscheidung zwischen beiden bei der vorliegenden Untersuchung möglich ist. Das 1-Methylxanthin zeigt im AAW-Laufmittel bedeutend grössere Rf-Werte.

Als erstes wurden 3-Methylxanthin, 1,7-Dimethylharnsäure und Kaffein ein- und zweidimensional auf Whatman-1-Papier chromatographiert. Als Laufmittel fanden aufsteigend BAW und absteigend AAW (vgl. unter 3b) Verwendung. Dabei zeigte sich, dass die Flecken von 1,7-Dimethylharnsäure und 3-Methylxanthin verschmelzen. Im BAW-Laufmittel besitzen sie gleiche Rf-Werte, im AAW-Laufmittel bleibt das 3-Methylxanthin hinter der 1,7-Dimethylharnsäure zurück. Die 1,7-Dimethylharnsäure zeigt dabei Schwanzbildung, wogegen 3-Methylxanthin als kompakter Flecken wandert. Die Schwanzbildung der 1,7-Dimethylharnsäure ist für die Verschmelzung der Flecken verantwortlich. Es gelingt aber oft gut, im UV-Licht das 3-Methylxanthin im Schwanze der 1,7-Dimethylharnsäure zu erkennen.

Je ein Extrakt aus den Versuchen B und D wurde zusammen mit 1,7-Dimethylharnsäure und 3-Methylxanthin nach der unter 3b beschriebenen Art zweidimensional chromatographiert (Laufmittel wie oben). Der 1,7-Dimethylharnsäure und 3-Methylxanthin enthaltende, UV-absorbierende Flecken wurde bestimmt. Darauf erfolgte die Einteilung der Fläche um und über den Flecken in Rechtecke. Nach dem Anfertigen einer Blende wurden diese Flächen mit dem GM-Zählrohr einzeln ausgemessen. Der aktivste Flächenausschnitt wurde lokalisiert. Auf diesem aktivsten Ausschnitt ist nun der 3-Methylxanthin-Flecken lokalisiert.

Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass radioaktives 3-Methylxanthin oder/und 7-Methylxanthin im Blattextrakt vorliegen.

7. Fütterung von Methyl-markiertem Kaffein

In gleicher Weise wie bei Versuch C, Abschnitt 3b, wurden einzelne Blätter mit Methylgruppen-markiertem Kaffein gefüttert und verarbeitet.

1. Versuch: Methylgruppe an N1 aktiv. 2. Versuch: Methylgruppe an N7 aktiv.

Blatt	Frisch-gewicht g	Fläche cm²
N1-markiert	0,70	35
N7-markiert	0,86	43

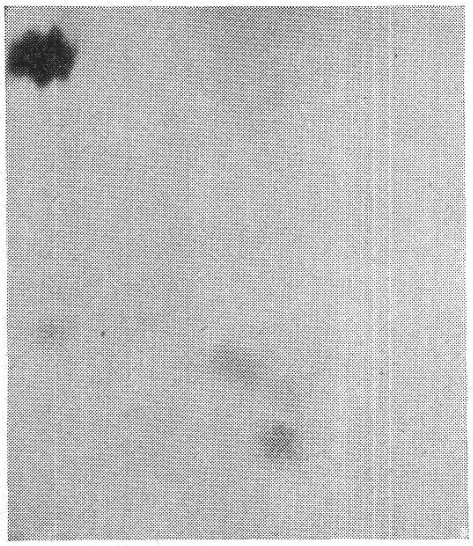
N1-Versuch: 5. Blatt von Sprossspitze, 11. Etage von oben; N7-Versuch: 5. Blatt von Sprossspitze, 11. Etage von oben eines mehrjährigen Baumes.

Chromatographieransatz: Extrakt, Methionin, Citrullin, Arginin und Serin (pH-Wert neutral).

Laufmittel: 1. aufsteigend. Phenol : Wasser 3 : 1. 2. absteigend. Butanol : Eisessig : Wasser 4 : 1 : 1.

Das Chromatographieren und Radiographieren geschah gleich wie bei Versuch A, Abschnitt 3b. Die Chromatogramme wurden mit Ninhydrin besprüht (Lokalisation der Aminosäuren). Die Radiographien für die N1-Methyl-Markierung und die N7-Methyl-Markierung sind gleich bezüglich der Lage der 4 radioaktiven Verbindungen, die neben dem Kaffein vorkommen. Keiner der radioaktiven Flecken fällt auf den Chromatogrammen mit dem Flecken einer der co-chromatographierten Aminosäuren zusammen.

Radiographie: Figur 11, N1-Methyl-Markierung.



Figur 11

N-Methyl-Kaffein-Fütterung (Erklärungen siehe Text)

Weiter wurde der N7-Methyl-Extrakt in den beiden Laufmitteln der übrigen Versuche (vgl. Versuch A, Abschnitt 3b: BAW aufsteigend, AAW absteigend) chromatographiert. Das Chromatogramm wurde in

kleine Flächen aufgeteilt (ähnlich Abschn. 6) und die Aktivität der einzelnen Flächen mit einem Zählrohr direkt auf dem Chromatogramm gemessen. Es gelang so, die Zentren der 4 radioaktiven Flecken zu bestimmen (vgl. Fig. 9, Methyl-markiertes Kaffein). Aus der Figur 9 geht hervor, dass die unbekannten Verbindungen X, Y und Z auf den Chromatogrammen mit C2- und C8-markiertem Kaffein wahrscheinlich identisch sind mit drei der vier unbekannten Verbindungen, die bei Fütterung von N1-Methyl- und N7-Methyl-markiertem Kaffein vorliegen.

8. Zusammenfassende Diskussion: Abbauprodukte

Die Arbeitshypothese (Abschn. 2), die den nach den heutigen Erkenntnissen möglichsten Weg darstellt, erwies sich als brauchbar. Als Schlüsselpunkt muss das Allantoin betrachtet werden. Dieses wird zur Allantoinsäure abgebaut, die nachgewiesen werden konnte. Der Schritt von der Allantoinsäure zum Harnstoff und der Glyoxylsäure ist sehr wahrscheinlich. Da das Allantoin den aktiven Kohlenstoff in den beiden Harnstoffgruppierungen trägt, entsteht beim Abbau über Allantoinsäure radioaktiver Harnstoff. Es kann wegen der chemischen Labilität der Allantoinsäure nicht mit Sicherheit aus den Harnstoffvorkommen auf den Chromatogrammen auf solche in den Blättern geschlossen werden. Im Abschnitt IV gelang es aber, aktives CO_2 als Abbauprodukt sowohl bei C2- als auch bei C8-markierter Kaffeinfütterung aufzufinden. Diese Beobachtung lässt sich so interpretieren, dass Allantoinsäure zu Harnstoff abgebaut und dieser durch die Urease in CO_2 und NH_3 gespalten wird. Das radioaktive CO_2 wurde aufgefangen.

Weniger durchsichtig sind die Schritte zwischen dem Kaffein und dem Allantoin. Dass das Allantoin in direkter Verbindung zum Kaffein steht und nicht über Umwege gebildet wird, ist aus der Verteilung der Aktivität im Allantoin auf die Ureidogruppen zu schliessen (nach Fütterung von C2- und C8-markiertem Kaffein). Auch die Oxydation in Stellung 8 muss auf einer Abbaustufe erfolgen, im Allantoin liegt das C8 des Kaffeins als Ketogruppe vor. Das Auffinden von radioaktivem 3-Methylxanthin (7-Methylxanthin) weist auf Demethylierungsschritte hin. In weitern methylierten Harnsäure- und Xanthinderivaten gelang es nicht, Aktivität nachzuweisen, obwohl eine grosse Zahl untersucht wurden (vgl. Abschnitt 3).

Sehr interessant sind die Beziehungen zwischen den Methyl-markierten und den ringmarkierten Kaffeinfütterungen. Es zeigte sich, dass die Abbauprodukte beider Ringmarkierungen (C2-Position und C8-Position) sich nicht unterscheiden. Ebenso ist zwischen den beiden Methyl-C-Markierungen (N1 und N7) kein Unterschied feststellbar. In den unbekannten Verbindungen X, Y, Z (Fig. 9) liegt eine Brücke zwischen Me-

thyl- und Ringmarkierungen vor. Sie kommen sowohl bei Methyl- als auch Ringmarkierungen vor. Es ist an zwei Erklärungsmöglichkeiten zu denken:

1. Die Verbindungen X, Y, Z sind direkte Abbauprodukte des Kaffeins.
2. Sie sind Verbindungen, die dem Cl-Stoffwechsel nahestehen, die Cl-Fragmente speichern.

Es erscheint unwahrscheinlich, dass sämtliche C 1-Körper in wenigen Verbindungen angehäuft werden, ohne in andere Verbindungen zu gelangen, die dem C 1-Stoffwechsel nahestehen (Aminosäuren, Abschn. 7). Die zum Teil sehr hohe Aktivität der unbekannten Verbindungen spricht auch eher für die erste Erklärungsmöglichkeit.

Es erscheinen im weiteren 2 Möglichkeiten zur Erklärung der beobachteten Tatsachen, wenn X, Y und Z direkte Abbauprodukte des Kaffeins sind.

Erstens, die Verbindungen X, Y und Z enthalten sowohl das C2-Atom als auch das C8-Atom des Kaffeins und, wie es scheint, die N1- und N7-Methylgruppen. Bei den Methylmarkierungen ist folgendes zu berücksichtigen: Abbauprodukte, welche aus dem gleichen Grundkörper bestehen, der eine bestimmte Zahl von N-Methylgruppen in verschiedenen Positionen trägt (vgl. z. B. Mono-Methylxanthine), besitzen in manchen Laufmitteln praktisch gleiche Rf-Werte. Es kann deshalb ohne genauere Untersuchung nur auf Grund der Rf-Werte nicht mit Sicherheit behauptet werden, dass bei den beiden Methylgruppenmarkierungen vollständig identische Verbindungen vorliegen.

Zweitens, es liegen Verbindungen vor, die entweder das C2-Atom oder das C8-Atom des Kaffeins, zusammen mit einer der beiden Methylgruppen, in Position 1 bzw. 7 besitzen. Die Verbindung mit dem C2-Atom und jene mit dem C8-Atom müssten identisch sein.

An dieser Stelle sei auf die Arbeit von Canellakis et al. (1955) hingewiesen. Es gelang, mit verschiedenen Peroxydasen Harnsäure abzubauen, wobei eine Vielzahl von Abbauprodukten isoliert werden konnten, die einerseits von der Peroxydase und anderseits von den gewählten Bedingungen abhängen. Auch die Uricase kann je nach Bedingungen verschiedene Abbauprodukte liefern. Bentley und Neuberger (1952) interpretieren diese Tatsache für die Uricase. Sie wiesen darauf hin, dass die Oxydation des Harnsäure-Monoanions zu einem instabilen Zwischenprodukt die einzige enzymatische Reaktion darstelle. Die weiteren Schritte vom unstabilen ersten Zwischenprodukt verlaufen spontan. Die äusseren Bedingungen wirken auf diese spontanen Schritte ein und vermögen sie in verschiedene Richtungen zu lenken.

VI. Zusammenfassung

1. In den *Coffea*-Blättern nimmt der Kaffeingehalt mit zunehmendem Alter ab. Es konnte gezeigt werden, dass diese Abnahme durch einen Abbau des Kaffeins zustande kommt. Nach der Fütterung von radioaktivem Kaffein an isolierte *Coffea*-Blätter gelang es, im Blatt radioaktive Abbauprodukte nachzuweisen. Die Abbaugeschwindigkeit von gefüttertem, aktivem Kaffein unterschied sich nicht wesentlich von jener des blatteigenen. Junge Blätter zeigten geringe oder kleine Abbauaktivität. Alte Blätter mit wenig Kaffein bauten viel gefüttertes, radioaktives Kaffein ab.

2. Mit radioaktivem Kaffein gefütterte Blätter (^{14}C2-, ^{14}C8-, $^{14}CH_3$-N7-markiert) gaben radioaktives CO_2 an die Aussenluft ab. Alte, ausgewachsene Blätter schieden mehr aus als junge, ausgewachsene oder junge, noch wachsende Blätter.

3. Eine Abbauhypothese wurde vorgeschlagen und experimentell untersucht. Es wurden verschiedene Fütterungs- und Extraktionsmethoden gewählt. Es gelang nach der Fütterung von C2- und auch von C8-ringmarkiertem Kaffein, Radioaktivität in Allantoin, Allantoinsäure und Harnstoff nachzuweisen. Es wurden Harnsäure, sämtliche Monomethylharnsäuren, 1,7- und 3,7-Dimethylharnsäure auf Radioaktivität geprüft, und es gelang nicht, Aktivität in diesen Verbindungen nachzuweisen. Von den Mono-Methylxanthinen fand man in 3- oder/und 7-Methylxanthin Aktivität.

4. Beim Allantoin wurde durch chemischen Abbau gezeigt, dass die Aktivität in den Ureidogruppen vorliegt.

5. Bei der Fütterung von Methyl-markiertem Kaffein (N1-Methyl, N7-Methyl) zeigten sich 4 stark aktive Abbauprodukte, die nicht als Aminosäuren (Methionin, Serin, Arginin, Citrullin), die dem C 1-Stoffwechsel nahestehen, identifiziert werden konnten. Es wurde gezeigt, dass diese 4 unbekannten Verbindungen auch bei der Fütterung von C2- und C8-ringmarkiertem Kaffein vorkommen. Es kann sich nicht um methylierte Xanthin- oder Harnsäurederivate handeln. Ihre mögliche Identität wurde diskutiert.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wanner im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich. Ich bin Herrn Prof. Dr. H. Wanner für die Überlassung des interessanten Themas, für sein kritisches Interesse und seine stets gewährte grosszügige Unterstützung dankbar.

Herr Prof. Dr. C.H. Eugster und dem Mikroanalytischen Labor des Organisch-Chemischen Institutes der Universität danke ich für die Durchführung der Mikro-N-Analysen.

Der Schweizer Kommission für Atomwissenschaft bin ich für die Bereitstellung wesentlicher materieller Hilfsmittel zu Dank verpflichtet.

Herrn A. Huber danke ich für die Erstellung verschiedener notwendiger Apparaturen.

Literaturverzeichnis

Albanese M. 1903. Sulla presenza di monometilxantina in alcuni vegetali. Bioch. Zentralblatt **1903**, 117–118.

Anderson L., Gibbs M. 1962. The biosynthesis of Caffeine in the Coffee Plant. J. Biol. Chem. **237**, 1941–1944.

Baeyer A. 1863. Untersuchungen über die Harnsäuregruppe. Ann. **127**, 1–27.

Behrend R., Schultz R. 1909. Über die Oxydation der Harnsäure in alkalischer Lösung. Ann. **365**, 21–37.

Benedikt S., Franke E. 1922. A method for the direct determination of uric acid in urine. J. Biol. Chem. **52**, 387–391.

Bentley M., Neuberger A. 1952. The mechanism of the action of Uricase. Biochem. J. **52**, 694–699.

Biltz H. 1912. Alloxan-anhydrid und seine Methylderivate. Ber. **45**, 3659–3675.

— Damm P. 1913. Über die Gewinnung von Dialursäure und Uramilen. Ber. **46**, 3662–3673.

— Damm P. 1917. Abkömmlinge der 3,7,9-Trimethylharnsäure. Ann. **413**, 186–197.

— Klein H. 1925. Abbau einiger Harnsäure-glykol-äther durch Lauge. Ber. **58**, 2740–2747.

— Marwitzky K., Heyn M. 1921. 7-Methylharnsäure und ihre Abkömmlinge. Ann. **423**, 122–146.

— Max F. 1921. Allantoin und seine Methylderivate. Ber. **54**, 2451–2476.

Bondzynski S., Gottlieb R. 1895. Über Methylxanthin, ein Stoffwechselprodukt des Theobromins und Coffeins. Ber. **28**, 1113–1118.

Bredereck H., Schuh H., Martini A. 1950. Neue Synthesen von Xanthin, Coffein und Theobromin. Ber. **83**, 201–211.

Brodie B., Axelrod J., Reichenthal J. 1952. Metabolism of Theophyllin in Man. J. Biol. Chem. **194**, 215–222.

Brown G., Roll P., Cavalieri L. 1947. The in vivo oxydation of uric acid. J. Biol. Chem. **171**, 835.

Brunel-Capelle G. 1950. Sur la mise en évidence de l'allantoïcase chez les êtres vivants. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **230**, 1979–1981.

Buchanan O., Block N., Christman A. 1945. The enzymatic determination of urinary uric acid. J. Biol. Chem. **157**, 181–187.

Canellakis E., Tuttle A., Cohen P. 1955. A comparative study of the end-products of uric acid oxydation by peroxydases. J. Biol. Chem. **213**, 397–404.

Dikstein S., Bergmann F., Chaimovitz M. 1956. Paperchromatography of substituted xanthines and uric acids. J. Biol. Chem. **221**, 239–251.

Echevain R., Brunel A., Sartorius J. 1940. Sur l'origine de l'allantoïne. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **211**, 71–73.

Fischer E. 1897. Neue Synthese der Harnsäure, des Hydroxycaffeins und des Aminodioxypurins. Ber. **30**, 559–573.

— Ach F. 1898. Weitere Synthesen von Xanthinderivaten aus methylierten Harnsäuren. Ber. **31**, 1980–1988.

— Clemm H. 1897. Über 1-Methyl- und 1,7-Dimethylharnsäure. Ber. **30**, 3089–3097.

Fosse R. 1926a. Un nouveau principe naturel des végétaux: L'acide allantoïque. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **182**, 869–871.

— 1926b. Présence de l'acide allantoïque dans le légume vert de *Phaseolus vulgaris*. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **183**, 1114–1116.

— Brunel A., de Graeve R. 1929a. Transformation diastasique de l'acide urique en acide allantoïque. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **189**, 213–215.

— Bossuyt R. 1929. Analyse quantitative et caractérisation de l'allantoïne. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **188**, 106–109.

— Brunel A., de Graeve R. 1929b. Sur l'allantoïnase et l'origine de l'acide allantoïque chez les végétaux. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **189**, 716–717.

— Brunel A., de Graeve R., Thomas P., Sarazin J. 1930a. Présence dans de nombreux végétaux alimentaires de l'allantoïne, accompagnée ou non d'acide allantoïque, d'allantoïnase et d'uricase. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **191**, 1153 bis 1155.

— Brunel A., de Graeve R., Thomas P., Sarazin J. 1930b. Application de la graine de *Soja hispida* privée d'uricase. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **191**, 1388 bis 1390.

— de Graeve R., Thomas P. 1932a. Un nouveau principe des végétaux: L'acide urique. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **194**, 1408–1413.

— de Graeve R., Thomas P. 1932b. Un nouveau principe des végétaux: L'acide urique. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **195**, 1198–1200.

— de Graeve R., Thomas P. 1933. Rôle de l'acide allantoïque chez les végétaux supérieurs. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **196**, 1264–1269.

— Thomas P., de Graeve R. 1934a. Allantoïne douée au pouvoir rotatoire. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **198**, 689–693.

— Thomas P., de Graeve R. 1934b. Allantoïne dextrogyre. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **198**, 1953–1955.

Gulland M., Holiday E., Macrae T. 1934. The constitution of the purine nucleosides. Chem. Soc. **1934**, 1639–1644.

Haley E., Lambooy J. 1954. Synthesis of D-Riboflavin-2-C^{14}. J. Am. Chem. Soc. **76**, 2926–2929.

Johnson E. 1952. The occurrence of substituted uric acids in human urine. Biochem. J. **51**, 133–138.

Kende H. 1960. Untersuchungen über die Biosynthese und Bedeutung von Trigonellin in *Coffea arabica*. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **70**, 233–267.

Klemperer F. 1945. Enzymatic oxydation of uric acid. J. Biol. Chem. **160**, 111–121.

Kogan L., Di Carlo F., Maynard N. 1953. Determination of caffein and trigonelline in coffee by paperchromatography. Anal. Chem. **25**, 1118–1120.

Krueger M., Schmidt P. 1900. Über das Verhalten von Theobromin, Paraxanthin und 3-Methylxanthin im Organismus. Ber. **32**, 2677–2682.

— 1900. Über den Abbau des Kaffeins im Organismus des Kaninchens. Ber. **32**, 3336 bis 3337.

Mothes K. 1958. Ammoniakentgiftung und Aminogruppenvorrat. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. VIII, S. 716–762. Springer-Verlag, Heidelberg.

— Romeike A. 1958. Die Alkaloide. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. VIII, S. 989–1049. Springer-Verlag, Heidelberg.

Murray A., Ronzio A. 1954. Atomic Energy Commission Report AECU 2838. Nuc. Sci. Abstracts 8, 3313.

Murray-Williams. 1958. Organic Syntheses with Isotopes. Part I, Interscience Publ., New York.

Myers V., Hanzal R. 1946. The metabolism of methylxanthins and their related methyluric acids. J. Biol. Chem. **162**, 309–323.

— Wardell E. 1928. The influence of the ingestion of methylxanthines on the excretion of uric acid. J. Biol. Chem. **77**, 697–722.

Organic Synthesis, 1957. Vol. **37**, S. 15–17. John Wiley, New York.

Paech K., Tracey M. 1955. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Bd. IV, S. 301–302. Springer-Verlag, Heidelberg.

Praetorius E. 1948. The enzymatic conversion of uric acid. Biochim. Biophys. Acta **2**, 602–613.

Reinbothe H. 1961a. Zur Biosynthese von Allantoin und Allantoinsäure in höheren Pflanzen. Flora **150**, 128–165.

— 1961b. Zur Biosynthese von Allantoin und Allantoinsäure in höheren Pflanzen. Flora **151**, 315–328.

Sixma F., Hendriks H., Helle K., Hollstein U., van Ling R. 1954. Micro-synthesis of cyanide from Barium carbonat. Rec. trav. chim. **73**, 161–166.

Sprinson D., Rittenberg D. 1952. The metabolic reactions of carbon atom 2 of L-Histidin. J. Biol. Chem. **198**, 655–661.

Tracey M. 1955. Urea and Ureides. In: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Bd. IV, S. 119–141. Springer-Verlag, Heidelberg.

Traube W. 1900. Der synthetische Aufbau der Harnsäure, des Xanthins, Theobromins, Theophyllins und Caffeins aus der Cyanessigsäure. Ber. **33**, 3035–3056.

Wanner H. 1960. Über die Verteilung von Kaffein und Trigonellin in den vegetativen Teilen von *Coffea arabica*. Alkaloid-Symposium, Halle (Saale).

— Blaim K. 1961. Ein Beitrag zur Biosynthese und Physiologie von Kaffein und Trigonellin bei *Coffea arabica*. Planta **56**, 499–510.

Weevers T. 1930. Die Funktion der Xanthinderivate im Pflanzenstoffwechsel. Arch. néerl. Sci. Exp. Nat., Sér. III, B **5**, 111–194.

Weinfeld H., Christman A. 1953. The metabolism of caffeine and theophyllin. J. Biol. Chem. **200**, 345–355.

Weygand F., Grosskinsky O. 1951. Zur Synthese von Guanin-(8-^{14}C). Ber. **84**, 839–843.