

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Humboldt-Universität zu Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. O. PROKOP)

Nachweis und papierchromatographische Auftrennung der barbituratfreien Sedativa Benedorm (Persedon), Elrodorm (Doriden), Noludar, Sedulon, Valamin, Bromural und Adalin sowie Antipyrin, Phenacetin und Meprobamat

Von

ARNOLD DRESSLER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 18. Juni 1960)

Während es über die papierchromatographische Auftrennung der Barbiturate zahlreiche Arbeiten gibt, mußte für den Nachweis von Stoffen neutraler oder nahezu neutraler Reaktion oft gezielt untersucht werden, was den Einsatz größerer Mengen Untersuchungsmaterials erfordert, die dem Analytiker nicht immer zur Verfügung stehen. Der Vorteil, die in der Überschrift angeführten 10 Wirkstoffe mit einem Startfleck papierchromatographisch aufzutrennen und nachzuweisen, ist offensichtlich.

Da erfahrungsgemäß an eine chemisch-toxikologische Untersuchung oft die Anforderung gestellt wird, in möglichst kurzer Zeit ein sicheres Analysenergebnis zu erarbeiten, und in dem Bestreben, das von uns beschriebene modifizierte Stas-Otto-Verfahren in bezug auf die neutrale Fraktion weiter auszubauen, wurde die Lösung dieses Problems in Angriff genommen. Besondere Aufmerksamkeit war darauf zu richten, daß die Analyse in kürzester Zeit durchführbar ist.

Von VIDIC wird eine papierchromatographische Auftrennung von Adalin, Bromural, Valamin, Doriden, Persedon, Noludar und Meprobamat beschrieben. Zur Sichtbarmachung dieser Substanzen wird deren Überführung in die Chloramine und die Reaktion derselben mit Benzidin-Kaliumjodid-Lösung angegeben. Die Auftrennung wird durch ein Gemisch von Benzin, Butanol und Wasser als mobile Phase erreicht. Um eine zur Auftrennung geeignete stationäre Phase zu schaffen, muß der mit den Startflecken versehene Streifen 12—14 Std in einer Wasserdampf-atmosphäre gesättigt werden, bevor die absteigende Chromatographie erfolgt. Ferner wird eine gute Temperaturkonstanz verlangt. Bei einem Butanolgehalt von 3% haben nach dem Verfahren von VIDIC sowohl Adalin und Bromural als auch die Pyridin- und Piperidinderivate deutlich unterschiedliche R_f -Werte. Dagegen verbleibt das Meprobamat am Startfleck, wodurch eine weitere Chromatographie mit einem Butanolgehalt von 7% notwendig wird. Die Laufzeit beträgt 3—4 Std.

Ausgehend von dem Gedanken, daß einmal R_f -Werte gewissen Schwankungen unterliegen, und zum anderen es nahezu unmöglich ist,

ein Anzeigereagens einzusetzen, das jede der 10 Substanzen spezifisch anfärbt, mußte ein Weg gefunden werden, auf *einem* Chromatogramm mehrere Farbreaktionen durchzuführen, wodurch der papierchromatographische Nachweis auch bei kleinen R_f -Wertdifferenzen möglich wird. Diese Anforderung wird durch die Breitkeilstreifenmethode, die von MATTHIAS zur Auftrennung von Aminosäuregemischen vorgeschlagen und von VOIGT für die Auftrennung der Lumi-Mutterkornalkaloide eingesetzt wurde, gut erfüllt.

Bei der Erarbeitung eines geeigneten Lösungsmittelgemisches als mobile Phase ergab sich die Notwendigkeit, als stationäre Phase vorbehandeltes Papier zu verwenden, um eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der zu analysierenden Stoffe zu erreichen. Außerdem mußte das vorbehandelte Papier längere Zeit haltbar sein, um bei Bedarf sofort eingesetzt werden zu können.

Präparierung des Papiers

Papiersorte Schleicher & Schüll 2043b. Die Abmessungen des Keilstreifens sind aus der Abbildung ersichtlich.

250 mg Agar-Agar werden mit 20 ml Wasser einen Tag vor der Präparierung des Papiers eingeweicht und am nächsten Tag unter Erwärmen bis nahe zum Sieden gelöst. Dann werden 10 ml Äthylenglykol hinzugefügt, kurz aufgeköcht und danach 70 ml Dimethylformamid zugesetzt. Man läßt wiederum kurz aufkochen, filtriert heiß, legt sofort die zum Aufhängen gelochten Keilstreifen (etwa 15 Stück) ein und beläßt sie 5—10 min in der Flüssigkeit. Danach werden sie auf Filterpapier ausgebreitet und nach etwa $\frac{1}{4}$ Std auf einen trockenen Filterbogen umgepackt und unter zeitweiligem Wenden 5—6 Std bei Raumtemperatur belassen. Die so vorbehandelten Keilstreifen werden in Filterpapier eingeschlagen und in einem gut verschlossenen Gefäß zur Verwendung bereitgehalten. Die Haltbarkeit beträgt mehrere Wochen.

Mobile Phase

Die Chromatographie erfolgt aufsteigend bei 20° C. Ein nennenswerter Einfluß bei Temperaturschwankungen von $\pm 2^\circ$ C konnte nicht beobachtet werden. Die mobile Phase besteht aus einem Gemisch von Methylal (Formaldehyd-dimethylacetal), Dekalin, Chloroform und n-Hexan im Verhältnis 11:3:3:8. Da es sich um ein einphasiges System handelt, ist dieses Gemisch schnell herstellbar. Die Laufzeit beträgt etwa 4 Std und die Lauffhöhe 18—20 cm.

Die sowohl für die stationäre Phase als auch für die mobile Phase verwandten organischen Lösungsmittel gelangten in der handelsüblichen Reinheit zur Verwendung. Sollte bei der Mischung der organischen Lösungsmittel für die mobile Phase eine Trübung auftreten, so ist dies erfahrungsgemäß auf einen Methanolgehalt des Methylals zurückzuführen. Zur Reinigung einer solchen Charge wurde zuerst zur Entfernung etwa vorhandenen Formaldehyds mit einer Lösung von 3 g Silbernitrat in 10 ml Wasser auf 1 kg Methylal versetzt, danach 10 ml 10%ige Natronlauge hinzugefügt und 2 Std lang geschüttelt. Nach Filtration und Trocknung mit Calciumchlorid wurde destilliert (Kp. 42,5° C) und ein vom VEB Berlin-Chemie freundlicherweise zur Verfügung gestelltes Molekularsieb 4 A hinzugefügt, nach mehrstündigem Stehen dann filtriert. So vorbehandeltes Methylal war ohne Trübung mit Chloroform, Dekalin und n-Hexan mischbar.

Die Substanzen verteilen sich mit guter Trennschärfe und unterschiedlichen R_f -Werten zonenförmig über den Keilstreifen (Abb. 1), ausgenommen das Phenacetin, das in gleicher Höhe wie Benedorm in Erscheinung tritt. Doch kann man durch Anwendung verschiedener Anzeigereagentien gut zwischen Benedorm und Phenacetin unterscheiden.

Zur Sichtbarmachung aller 10 Wirkstoffe sind 2 Anzeigereagentien notwendig:

1. 1%ige wäßrige Lösung von Quecksilber-I-nitrat;
2. Überführung in die Chloramine durch Behandlung mit Chlor und nachfolgende Reaktion mit Benzidin-Kaliumjodid-Lösung.

In der Praxis wird man am besten so verfahren, daß man sich aus der Mitte des Keilstreifens zur Erfassung aller möglichen R_f -Werte zwei schmale Streifen ausschneidet und einen Streifen mit Reagens 1 behandelt, wodurch Elrodorm, Valamin und Antipyrin angezeigt werden, und den anderen Streifen nach der Chlorierung mit Reagens 2, wodurch bis auf Antipyrin und Elrodorm (dieser Wirkstoff gibt bei dieser Art Chromatographie keine positive Reaktion) die restlichen Wirkstoffe sichtbar werden.

Auf Grund der so erhaltenen R_f -Werte kann man nun auf die in Frage kommenden Substanzen mit weiteren Sprühreagentien gezielt untersuchen. Bei der Ausarbeitung dieser Chromatographie wurden die angeführten Wirkstoffe in Mengen von 30 γ eingesetzt.

Da die Anzeigemethoden nicht spezifisch sind und auch die R_f -Werte gewissen Schwankungen unterliegen — erfahrungsgemäß $\pm 0,02$ —, kann man zur weiteren Stützung des Untersuchungsergebnisses im unbehandelten Chromatogramm noch weitere Anzeigereagentien einsetzen und damit eine eventuell falsch-positive Reaktion erkennen, was besonders bei der Aufarbeitung von biologischem Material, wo man immer mit Störungen rechnen muß, von Vorteil ist.

Folgende Reagentien finden zur Sichtbarmachung der 10 Wirkstoffe Verwendung:

Reagens 1: 1%ige wäßrige Lösung von Quecksilber-I-nitrat.

Es empfiehlt sich, das Quecksilber-I-nitrat 2 Std lang mit dem Wasser zu schütteln und dann, wenn notwendig, zu filtrieren.

Reagens 2: 1. Benzidin-Lösung.

2 g Benzidin werden mit 500 ml 2%iger Essigsäure 3 min lang geschüttelt und in ein Vorratsgefäß filtriert.

2. 1%ige wäßrige Kaliumjodid-Lösung.

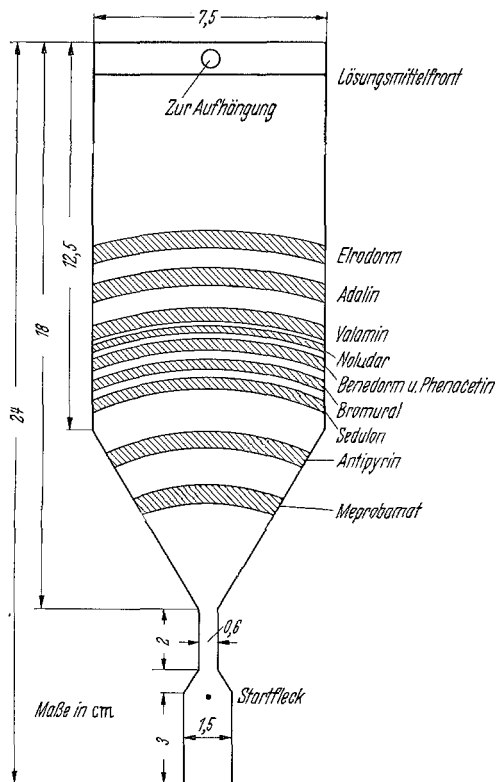


Abb. 1

Kurz vor Gebrauch werden 17,5 ml Benzidin-Lösung und 7,5 ml Kaliumjodid-Lösung gemischt.

Die Chlorierung erfolgt durch Einhängung des Streifens in eine Chloratmosphäre während 1 min. Es ist darauf zu achten, daß das Papier lösungsmittelfrei ist. Nach der Chlorierung wird der Papierstreifen einige Minuten zur Vertreibung des überschüssigen Chlors einem intensiven Luftstrom ausgesetzt (Abzug) und dann durch das Benzidin-Kaliumjodidgemisch gezogen.

Reagens 3: Hydroxylamin-Reagens.

1. 14 g NaOH mit Wasser auf 100 ml auffüllen und lösen.
2. 13,8 g Hydroxylaminhydrochlorid in Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.
3. Ein Drittel 5% ige wäßrige Eisen-III-chlorid-Lösung + zwei Drittel Methanol.
4. Eisessig.

Reagens 4: 1. 20% ige methanolische Kalilauge.

2. 1% ige methanolische m-Dinitrobenzol-Lösung.

Reagens 5: 1. 0,05% ige Lösung von Na-Rhodizonat in Wasser (jedesmal frisch ansetzen).

2. n/20 Silbernitrat-Lösung.

Reagens 6: 1% ige Lösung von Kaliumbichromat in 5% iger Schwefelsäure.

Reagens 7: Dragendorffsches Reagens.

Reagens 8: 1. Kalt gesättigte Lösung von Fluorescein in Eisessig (im Kühlschrank etwa 4 Wochen haltbar), davon 10 ml mit Eisessig auf 25 ml auffüllen, dann auf 50 ml mit Perhydrol auffüllen und 2 ml 0,5% ige wäßrige Kupferacetat-Lösung hinzufügen.

2. 2% ige alkoholische Kalilauge.

Reagens 9: 10% ige Lösung von konzentrierter Schwefelsäure in Äthanol.

Benedorm

Das Benedorm hat im Chromatogramm einen R_f -Wert von 0,56. Unter der Analysenquarzlampe ist in dieser Höhe bei der Behandlung mit Ammoniakdämpfen die bekannte hellblaue Fluoreszenz zu beobachten. In größeren Mengen erfolgt auch eine schwache Anfärbung mit Reagens 1. Mit Reagens 2 erhält man eine blaue Zone. Zur weiteren Identifizierung dient Reagens 3. Man besprüht einen Streifen des Chromatogramms mit einer Mischung gleicher Teile Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung und Natronlauge-Lösung und läßt $\frac{1}{2}$ Std mit Filterpapier bedeckt liegen. Schon nach etwa 10 min tritt eine deutliche Gelbfärbung auf. Man besprüht danach mit der Eisen-III-chlorid-Lösung und nach 2 min zur Aufhellung des Chromatogramms mit Eisessig, wobei mitunter erst nach Stunden eine blaugrüne Anfärbung erfolgt. Dieses Reagens wurde mit gewissen Abwandlungen von SHEPPARD u. Mitarb. übernommen.

Elrodorm

Der R_f -Wert des Elrodorms beträgt 0,73. Es wird von Reagens 1 angezeigt, durch Reagens 2 dagegen nach unseren Erfahrungen nicht. Reagenz 3 wird in gleicher Weise, wie beim Benedorm beschrieben, eingesetzt, wobei eine rotbraune Anfärbung erhalten wird.

Noludar und Sedulon

Der R_f -Wert des Noludars beträgt 0,59, der des Sedulons 0,50. Beide Wirkstoffe werden mit Reagens 2 als blaue Zone angezeigt. Als weiteres Nachweisreagens dient Reagens 4. Der Streifen wird mit 20%iger methanolischer Kalilauge besprüht, etwas einwirken gelassen und anschließend mit der 1%igen methanolischen m-Dinitrobenzol-Lösung besprüht. Im warmen Luftstrom (Fön) erscheint das Noludar als hellrotviolette Zone, die nach einiger Zeit verschwindet, und das Sedulon als braunrote Zone, die etwas länger beständig ist.

Valamin

Das Valamin hat den R_f -Wert 0,61 und kann sowohl mit Reagens 1 als auch mit Reagens 2 sichtbar gemacht werden. Zur weiteren Identifizierung wird Reagens 4, das von K. FISCHER und W. SPECHT in etwas abgeänderter Form übernommen wurde, verwendet. Der Streifen wird mit der Natrium-Rhodizonat-Lösung bis zur deutlichen Gelbfärbung besprüht und anschließend mit einer n/20 Silbernitrat-Lösung nachgesprüht. Das Valamin wird dabei als hellrote Zone sichtbar.

Adalin und Bromural

Der R_f -Wert des Adalins beträgt 0,67, der des Bromurals 0,53. Beide Wirkstoffe können mit Reagens 2 sichtbar gemacht werden. Zur weiteren Identifizierung dient Reagens 8. Der Streifen wird mit der Fluorescein-Perhydrol-Lösung besprüht, $\frac{1}{2}$ Std bei 90—100° C im Trockenschrank belassen und dann zur besseren Sichtbarmachung der entstandenen roten Anfärbung mit 2%iger alkoholischer Kalilauge besprüht. Dieses Reagens wurde von A. S. CURRY übernommen.

Meprobamat

Das Meprobamat zeigt einen R_f -Wert von 0,32. Es kann mit Reagens 2 als schwarzblaue Zone sichtbar gemacht werden. Diese Reaktion ist sehr empfindlich. Zur weiteren Sicherung des Untersuchungsergebnisses kann Reagens 9 dienen. Der Streifen wird mit der äthanolischen Schwefelsäure besprüht und mindestens 3 min mit einem warmen Luftstrom (Fön) behandelt. Danach wird das Meprobamat als schwach rötlichbraune Zone angezeigt.

Antipyrin

Antipyrin hat den R_f -Wert 0,41. Es wird mit Reagens 1 sichtbar gemacht. Zur weiteren Identifizierung dient das Dragendorffsche Reagens, wobei eine rotbraune Zone erscheint.

Phenacetin

Phenacetin liegt in gleicher Höhe mit Benedorm (R_f -Wert 0,56). Es wird durch Reagens 2 als dunkelbraune Zone angezeigt. Zur weiteren Identifizierung dient Reagens 6. Der Streifen wird mit der Bichromat-Schwefelsäurelösung besprüht und während 3 min in einen auf 90 bis 100° C vorgeheizten Trockenschrank gebracht. Das Phenacetin erscheint als schmutziggelbe Zone.

Tabelle

Substanz	Reagens									R_f -Wert (gemessen in der Mitte des Keilstreifens)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Adalin	—	+	—	—	—	—	—	+	—	0,67
Antipyrin	+	—	—	—	—	—	—	+	—	0,41
Benedorm	—	+	+	—	—	—	—	—	—	0,56
Bromural	—	+	—	—	—	—	—	+	—	0,53
Elrodorm	+	—	+	—	—	—	—	—	—	0,73
Meprobamat	—	+	—	—	—	—	—	—	+	0,32
Noludar	—	+	—	+	—	—	—	—	—	0,59
Phenacetin	—	+	—	—	—	+	—	—	—	0,56
Sedulon	—	+	—	+	—	—	—	—	—	0,50
Valamin	+	+	—	—	+	—	—	—	—	0,61

Zeichenerklärung: — keine Reaktion; + positive Reaktion.

Da dem Einsatz weiterer und eventuell empfindlicherer Nachweisreagentien nichts im Wege steht, dürften die Untersuchungsergebnisse der beschriebenen Chromatographie auch den Analytiker ansprechen, der der Papierchromatographie, die sich nur auf R_f -Wertunterschiede und kaum spezifische Nachweisreagentien stützt, besonders in bezug auf Verarbeitung von biologischem Material kritisch gegenübersteht.

Diese Art der Chromatographie wird seit einigen Monaten am hiesigen Institut als Routine-Methode bei den anfallenden Untersuchungen mit guten Ergebnissen durchgeführt. Es konnten bisher Elrodorm, Benedorm, Adalin und Phenacetin in verschiedenen Fällen aus Organen und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Auch bei der Untersuchung unbekannter Arzneimittel lieferte diese Chromatographie schnelle und sichere Ergebnisse.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine papierchromatographische Methode beschrieben, die es ermöglicht, Benedorm (Persedon), Elrodorm (Doriden), Noludar, Sedulon, Valamin, Meprobamat, Adalin, Bromural sowie Phenacetin und Antipyrin papierchromatographisch zu erfassen und die Untersuchungsergebnisse durch Verwendung weiterer Sprühreagentien abzusichern. Auf die Brauchbarkeit dieser Methode bei

Untersuchungen aus biologischem Material und bei der Analyse fraglicher Arzneimittelpreparate wird hingewiesen.

Den Firmen Bayer-Leverkusen, VEB Berlin-Chemie, VEB Chemische Fabrik van Heyden, Deutsche Hoffmann-La Roche AG, VEB Deutsches Hydrierwerk Rodleben, Schering AG Berlin-West sei hier nochmals bestens für die Bereitstellung der Reinsubstanzen gedankt.

Literatur

- CUREY, A. S.: The Detection of β -Bromallyl Barbiturates on Paper Chromatograms. *Acta pharmacol. et toxicol.* **13**, 357—358 (1957).
- DRESSLER, A., M. MÜLLER u. H. SCHÖNFELD: Über die Isolierung reiner Barbiturate im Verlauf der chemisch-toxikologischen Analyse. *Arch. Toxikol.* **17**, 286—292 (1959).
- FISCHER, K., u. W. SPECHT: Zum Nachweis von „Valamin“ (1-Äthylcyclohexylcarbamat). *Arch. Toxikol.* **17**, 48—52 (1958).
- MATTHIAS, W.: Über ein papierchromatographisches Verfahren für Serienuntersuchungen in der Pflanzenzüchtung. *Züchter* **24**, 313 (1954).
- MATTHIAS, W.: Über eine einfache Methode für papierchromatographische Untersuchungen (Keilstreifenverfahren). *Naturwissenschaften* **43**, 351 (1956).
- SHEPPARD, HERBERT, BARBARA S. D'ASARO and ALBERT J. PLUMMER: The Detection of Doriden and a Metabolite in Dog Urine. *J. Amer. pharm. Ass., sci. Ed.* Nr 10, 681 (1956).
- VIDIC, ERNST: Papierchromatographische und spektralphotometrische Identifizierung barbitursäurefreier Sedativa, insbesondere von Meprobamat. *Arch. Toxikol.* **17**, 373—386 (1959).
- VOIGT, R.: Zur Papierchromatographie der Lumi-Mutterkornalkaloide. *Pharmazie* **13**, 294—297 (1958).

Dipl.-Chemiker ARNOLD DRESSLER,
Institut für gerichtliche Medizin der Humboldt-Universität,
Berlin N 4, Hannoversche Straße 6