

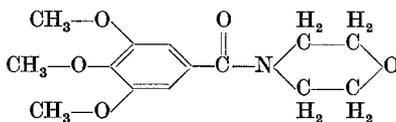
Untersuchungen zum dünn-schichtchromatographischen Nachweis eines neuartigen Tranquilizers aus der Trioxazin-Reihe (Versuchspräparat Nr. 518 der Firma Knoll AG.)*

E. BURGER

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. B. MUELLER)

Eingegangen am 1. August 1967

Die neuartige Tranquilizersubstanz, über die im einschlägigen Schrifttum toxikologisch-analytisch noch nicht berichtet wurde, enthält die biologisch aktive Trimethoxyphenylgruppe, die in verschiedenen Pflanzenalkaloiden wie Colchizin, Mescaline und Reserpin enthalten ist. Der Name der Verbindung „Trioxazin“, leitet sich aus der Synthese von Trimethoxybenzoesäure mit einem Oxazinring her und sie hat die folgende Strukturformel:



Es ist eine weiße, kristalline, beständige Substanz mit einem Schmelzpunkt bei 121° C, die in Wasser und Äthanol nur wenig, in Methanol und Aceton gut und in Chloroform sehr gut löslich ist. Als Tranquilizer von niedriger Toxizität ist die Verbindung unter dem Handelsname „Trioxazin-Egypt“ in Ungarn seit 5 Jahren in Gebrauch. In unserer Bundesrepublik findet man den Tranquilizer in dem Kreislaufmittel „Sedamiroton“, Hersteller Chemische Werke Minden, in einer Menge von 150 mg/Dragee neben Miroton enthalten.

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich, daß die Substanz nicht nur aus basischem, sondern besser aus saurem Milieu mit Chloroform extrahiert werden kann und dadurch eine Trennung von Alkaloiden und anderen basischen Stoffen möglich ist. Sie läßt sich unzersetzt im Mikro-

* Vorgetragen auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Gerichtliche und Soziale Medizin in Freiburg i. Br. im Oktober 1966.

sublimationsgerät oberhalb des Schmelzpunktes zu feinen Nadelchen sublimieren. Bei der Verseifung mit Lauge in der Hitze spaltet sie sich in Trimethoxybenzoesäure und Morpholin auf. Trimethoxybenzoesäure kann danach durch Ansäuern ausgefällt werden.

Für den Nachweis der Substanz auf der Dünnschichtplatte haben wir uns bemüht ein geeignetes Detektionsmittel zu finden. Die Nachweisreagentien für basische Substanzen versagen hier. Mit MILLON's-Reagens reagiert die Substanz mit brauner Verfärbung, jedoch nicht ausreichend empfindlich. Wir fanden schließlich, daß stark oxydierende Agentien Färbungen ergeben, die sich für den Nachweis auf der Platte eignen. Man kann Brom- oder Stickstoffdioxidämpfe einwirken lassen. Mit Vanadinschwefelsäure, dem Reagens nach MANDELIN, erhält man eine violette Anfärbung. Am empfindlichsten erwies sich jedoch das von SCHULTZ und STRAUSS für den Nachweis von Alkaloiden verwandte Cer-Reagens, ein abgeändertes Reagens nach SONNENSCHNEIN, das aus einer Auflösung von Cer(IV)sulfat in Trichloressigsäure und Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure besteht. Trioxazin reagiert damit sofort zu einer karminrosa Färbung. Die Nachweisempfindlichkeit auf der Platte ist dabei so, daß noch 5 µg der Substanz erkannt werden können. Dieses Detektionsmittel ist keineswegs spezifisch für unsere Substanz; auch Mescaline reagiert, wie wir feststellen konnten, zu einer gleichen und noch intensiveren Färbung. VIDIC und SCHÜTTE geben mit dem Reagens positive Reaktionen mit basischen Stoffen wie Brucin, Narcotin und Emetin an. Wir selbst fanden bei 4 verschiedenen basischen Antihistaminica-Substanzen rosa Anfärbungen. Bei Zugabe von konzentrierter Salpetersäure zu Trioxazin findet man, daß sofort eine tiefrote Färbung entsteht, die einige Minuten bestehen bleibt um dann in gelb überzugehen.

Es wurden von uns Versuche über den Nachweis der Substanz nach Körperpassage durchgeführt. Dabei wurden Versuchspersonen Mengen zwischen 600 und 1200 mg verabreicht. Die 12 Std-Sammelurinproben wurden nach Ansäuern mit Salzsäure einer Ausschüttelung mit Chloroform unterzogen und die Abdunstrückstände zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung verwendet. Wir benutzten für die Schichtchromatographie Kieselgel G F₂₅₄ (Merck) und fanden, daß sowohl die Reinsubstanz als auch die vorhandenen Metabolite nach dem Entwickeln sich unter der kurzwelligen U.V.-Lampe als tiefviolette Flecke darstellen.

Als Fließmittel eignet sich nach unseren Untersuchungen ein Gemisch aus gleichen Teilen von Chloroform, n-Heptan und Äthanol. Fließmittel mit basischen Zusätzen ergaben dagegen keine ausreichenden Auftrennungen. Auf der Kieselgel-GF-Platte erhielten wir für die Reinsubstanz einen R_f-Wert von 0,85. Metabolite erschienen bei den R_f-Werten von 0,77, 0,68 und 0,57.

Chromatogramme mit den jetzt im Handel befindlichen Dünnschichtfertigplatten der Fa. Merck waren, wie zu erwarten, von ausgezeichneter Trennschärfe und einer besseren Reproduzierbarkeit der R_f -Werte, als bei selbst angefertigten Platten. Die Fertigplatten haben wir vor Gebrauch $\frac{1}{2}$ Std bei 110°C aktiviert und sie ferner so in das Fließmittel eingestellt, daß der vorhandene Seitenrand in der Flüssigkeit stand. Die Substanzflecken wurden dadurch in schlanker Form erhalten. Beim Besprühen der mit den Harnextrakten entwickelten Platten mit dem Cer-Reagens zeigte sich eine rosa Anfärbung der Reinsubstanz, eine stärkere rosa Anfärbung des Metaboliten bei R_f 0,77 sowie schwächere Anfärbungen der restlichen Metaboliten. Die rosa Farbe verschwindet nach kurzer Zeit und geht bei der Reinsubstanz und dem ersten Metaboliten in Gelb über.

Die Ausscheidungsverhältnisse nach Einnahme von z.B. 900 mg Trioxazin waren so, daß nach den ersten 24 Std noch Reinsubstanz zum Nachweis kam. Danach erschien in überwiegender Menge der Metabolit Nr. 1. Bei einem Harnextrakt der ersten 3 Std nach der Einnahme des Mittels erhielten wir nach der Auftrennung neben der Reinsubstanz nur den ersten Metaboliten. Wurde der Abdunstrückstand eines Harnextraktes mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure versetzt, so entstand bei Anwesenheit der Reinsubstanz sofort, die bereits erwähnte, tiefrote Färbung. Auch bei Zugabe von Salpetersäure zu Sammelurin der Versuche konnte die Färbung, vor allem bei senkrechter Durchsicht durch das Reagensglas, beobachtet werden. Schließlich wäre noch hinzuzufügen, daß Trioxazin mit dem Detektionsmittel Quecksilbernitrat, das für Barbiturate angewandt wird, nicht reagiert und andererseits das Cer-Reagens nicht mit Barbituraten Färbungen ergibt.

Summary

The tranquilizer-substance "Trioxazine" is described and investigations were made for detecting the substance and its metabolites in the urine after intake. It was found, that the unchanged tranquilizer as well as 3 metabolites were excreted. The substance could easily be extracted out of urine with chloroforme after acidifying with hydrochloric acid. The extract was separated on silica-gel GF₂₅₄-thinlayer-plate in the solvent CHCl_3 -n-Heptan-Ethanol (1:1:1). For the detection of the substances on the plate it was found, that spraying them with a modified reagent of SONNENSCHNEIN, consisting of Cer(IV)sulphate, trichloroacetic acid and conc. sulfuric acid give red spots. An amount of $5\ \mu\text{g}$ of Trioxazine can thus be detected. Trioxazine also reacts with conc. nitric acid to a deep red colour.

Literatur

- SCHULTZ, F., u. H. STRAUSS: Der papierchromatographische Nachweis von Alkaloiden. *Arzneimittel-Forsch.* **5**, 342 (1955).
- VIDIC, E., u. J. SCHÜTTE: Ein papierchromatographischer Analysengang für toxiologisch wichtige basische Gift- und Arzneistoffe. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **295**, 342 (1961).
- Firmenschrift der Chemischen Fabriken Knoll A. G., Ludwigshafen.

Dr. rer. nat. EBERHARD BURGER
Institut für gerichtliche Medizin der Universität
69 Heidelberg, Voßstr. 2