

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 115–120

Isolierung einiger Metaboliten des Mephenoxalone (Control-OM) aus menschlichem Harn und ihre Identifizierung

Von G. Eckhardt

Institut für Organische und Biochemie der Universität Bonn,

S. Goenechea und W. Gielsdorf

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn

(Eingegangen am 12. Juni/12. Oktober 1976)

Zusammenfassung: Mephenoxalone (5-(*o*-Methoxyphenoxymethyl)-2-oxazolidon) wird im menschlichen Körper auf verschiedenen Wegen abgebaut, z. T. unverändert ausgeschieden. Bei der Biotransformation des Mephenoxalone findet eine Spaltung der Phenoxymethylätherbindung statt; so konnten im Harn *o*-Methoxyphenol (Metabolit I) und – nach alkalischer Hydrolyse – 3-Amino-1,2-propandiol (IIa) identifiziert werden. Durch Hydroxylierung des Benzolringes entsteht ein phenolisches Hydroxymephenoxalone (Metabolit III) und durch Demethylierung wird Mephenoxalone in Desmethylmephenoxalone (Metabolit IV) umgewandelt. Die Öffnung des Oxazolidonringes führt zur Entstehung von 1-(*o*-Methoxyphenoxy)-3-aminopropan-2-ol (Metabolit V). Im Harn wurden ferner zwei weitere Substanzen gefunden: 1-(*o*-Hydroxyphenoxy)-3-aminopropen (Metabolit VI) und Dehydromephenoxalone (Metabolit VII). Bei VI könnte es sich um ein Artefakt handeln. Die Verbindungen III, IV und VII waren nach saurer Hydrolyse und nach enzymatischer Spaltung mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase, V und VI dagegen nur nach Säurespaltung nachweisbar. Bei den dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen ergaben sich außerdem Hinweise auf drei weitere Metabolite, deren Identifizierung jedoch nicht gelang.

Isolation and identification of some metabolites of mephenoxalone (Control-OM) from human urine

Summary: Mephenoxalone (5-(*o*-methoxyphenoxymethyl)-2-oxazolidone) is degraded by various routes in the human, and some is excreted unchanged. In the metabolism of mephenoxalone, the phenoxymethyl ether bond is cleaved; thus *o*-methoxyphenol (metabolite I) was identified in urine, and 3-amino-1,2-propanediol (IIa) was found after alkaline hydrolysis. Hydroxylation of the benzene ring produces a phenolic hydroxymephenoxalone (metabolite III), and demethylation converts mephenoxalone into demethylmephenoxalone (metabolite IV). Opening of the oxazolidone ring leads to the production of 1-(*o*-methoxyphenoxy)-3-aminopropane-2-ol (metabolite V). Urine contains two further substances: 1-(*o*-hydroxyphenoxy)-3-aminopropene (metabolite VI) and dehydromephenoxalone (metabolite VII). Metabolite VI may be an artefact. Compounds III, IV and VII could only be detected after acid hydrolysis and enzymic cleavage with β -glucuronidase/aryl sulphatase, whereas V and VI were detected only after acid hydrolysis. Thin layer chromatography revealed three further metabolites, which were not identified.

Einführung

Mephenoxalone (5-(*o*-Methoxyphenoxymethyl)-2-oxazolidon) wird als tensioytisches Neurosedativum und Ataraktikum verwendet (1). Bei Versuchen mit Hunden wurde festgestellt, daß nur etwa 1,6 bis 2,5% des verabreichten Mephenoxalone wiedergefunden werden. Hierbei wurden zwei isomere Phenole – vermutlich 4'- und 5'-Hydroxymephenoxalone – frei oder konjugiert gefunden. Dieselben Metaboliten wurden im menschlichen Urin nachgewiesen (2).

In den vorliegenden Untersuchungen konnten – neben dem unveränderten Wirkstoff – 10 Ausscheidungsprodukte im menschlichen Harn isoliert und identifiziert werden.

Arbeitsmethodik

Eine gesunde, männliche, 24jährige, freiwillige Versuchsperson erhielt für eine Woche dreimal täglich je eine Tablette Control-OM – entsprechend 1500 mg Mephenoxalone pro Tag. Der Pro-

band hatte mindestens drei Wochen vor dem Versuch keinerlei Arzneimittel eingenommen. Nach Beginn der Medikamenteneinnahme wurde der Harn bis einschließlich drei Tage nach der letzten Gabe gesammelt und bis zur Aufbereitung in Glasflaschen gekühlt aufbewahrt (+ 4 °C, keine Zusätze).

Vor Versuchsbeginn wurden von dem Probanden zwei Liter Harn gesammelt und genauso wie die medikamentenhaltigen Proben extrahiert und untersucht.

Extraktion des Harnes

Der Harn (insgesamt 15 Liter) wurde zuerst mit HCl (100 g/kg) auf pH 1–2 eingestellt und mit Chloroform extrahiert (Extrakt 1) und dann mit NaOH-Lösung (100 g/kg) alkalisiert (pH 13–14) und erneut mit Chloroform ausgeschüttelt (Extrakt 2). Die wäßrige Phase wurde anschließend mit HCl neutralisiert und nochmals mit Chloroform extrahiert (Extrakt 3). Die wäßrige Phase (5 Teile) wurde danach mit HCl (370 g/kg) (1 Teil) versetzt und 3 Stunden unter Rückfluß hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann wie oben angegeben nochmals bei saurer (Extrakt 4), bei alkalischer (Extrakt 5) und bei neutraler (Extrakt 6) Reaktion mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und in vacuo bei 40 °C eingedampft.

Gewinnung der Konjugate und enzymatische Spaltung
5 Liter Harn wurden zuerst – zur Abtrennung der nichtkonjugierten Ausscheidungsprodukte – wie oben angegeben bei saurer, alkalischer und neutraler Reaktion mit Chloroform extrahiert. Die Konjugate wurden dann mit Bleiacetat gefällt. Der Niederschlag wurde anschließend filtriert, gewaschen, in Methanol aufgenommen und die Pb-Ionen durch Einleiten von H₂S gefällt. Nach Filtration wurde das Filtrat eingedampft, und die Konjugate wurden in Wasser gelöst (genaue Vorschrift l. c. (3a), (3b)).

Die wäßrige Lösung (10 ml) wurde mit 2 ml einer stabilisierten, wäßrigen Lösung von β -Glucuronidase/Arylsulfatase (E. Merck, Darmstadt) versetzt und für etwa eine Woche bei pH 5,5 in einem verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur belassen. Die wäßrige Phase wurde anschließend bei pH 1–2, pH 13–14 und pH 7 mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte wurden dann wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Gewinnung von 3-Amino-1,2-propandiol

2 Liter medikamentenhaltigen Harns und 500 ml einer medikamentenfreien Harnprobe desselben Probanden wurden jeweils mit NaOH alkalisiert (pH 13–14) und drei Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur wurde dasselbe mit Chloroform/Isopropanol (Volumina, 3 + 1) extrahiert und das Lösungsmittelgemisch am Rotationsverdampfer bei etwa 40 °C abgezogen.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden Platten von 200 mm X 200 mm verwendet. Als Trägermaterial wurde Kieselgel PF₂₅₄₊₃₆₆ (E. Merck, Darmstadt) benutzt. Die Platten für die qualitative Chromatographie wurden nach dem Standardverfahren von Stahl (4) beschichtet. Für die präparative Schichtchromatographie wurde jede Platte mit einem aus 15 g Kieselgel und 35 ml Wasser hergestellten Brei per Hand beschichtet. Die Platten wurden dann 24 Stunden an der Luft getrocknet und 2 Stunden im Trockenschrank bei 110 °C aktiviert.

Als Fließmittel dienen:

- A. Benzol/Aceton/Ameisensäure (Volumina 70 ml + 29 ml + 1 ml) (5)
- B. Methanol/Ammoniaklösung (250 g/kg) (Volumina 100 ml + 1,5 ml) (6)
- C. Benzol/Aceton/Ameisensäure (Volumina 40 ml + 60 ml + 1 ml)
- D. Benzol/Aceton (Volumina 3 ml + 1 ml bis 1 ml + 3 ml)
- E. Chloroform/Äthanol/Ammoniak-Lösung (250 g/kg) (Volumina 80 ml + 15 ml + 5 ml) (7)

Für die präparative Schichtchromatographie wurde immer die Technik der Mehrfachentwicklung angewandt.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte bei Tages- und im kurz- und langwelligen UV-Licht; gegebenenfalls wurden sie dann mit einem Reagenz behandelt; bei der präparativen Schichtchromatographie wurde ein Randstreifen besprüht.

Als Nachweisreagenzien wurden benutzt:

1. Kaliumjodoplatinat (8)
2. Dragendorff-Reagenz mod. nach Munier & Macheboef (8)
3. Echtblausalz B (5 g/l Wasser); Nachbehandlung mit 1 mol/l NaOH-Lösung (8)
4. Eisen(III)-chlorid, 50 g/l Wasser (6)

Bei der präparativen Schichtchromatographie wurden die substanzhaltigen Zonen abgeschabt und das Kieselgel auf eine in einem ausgezogenen Glasrohr (Höhe 50 mm; Durchmesser 8 mm) befindliche Schicht geglähten Seesandes gegeben und die Substanzen mit Methanol/Chloroform (Volumina, 1 ml + 3 ml bis 3 ml + 1 ml) unter leichtem Druck (Gummiballon) eluiert. Das Eluat wurde dann in vacuo eingengt und das Lösungsmittel mit Stickstoff oder Warmluftstrom vollständig verdampft (9).

Geräte

Die UV-Spektren wurden mit einem Leitz-Unicam-Spektrophotometer SP 800 B aufgenommen. Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer Modell 221 mit Gitter-Prisma-Austauscheinheit – wenn nicht anders angegeben – in KBr unter Standardbedingungen. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte durch direkte Einführung in das MS-9 (AEI) bei einer Ionenquellentemperatur von 150–190 °C, einem Emmissionsstrom von 100 μ A und Ionisierungsenergien von 12 und 70 eV. Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit einem Varian HA 100 MHz bzw. EM-360 60 MHz-Spektrometer aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1 zeigt die Substanzen, die nach Einnahme von Mephenoxalone in den verschiedenen Harnextrakten der Versuchsperson nachgewiesen wurden.

Vor der salzsauren Hydrolyse wurden insgesamt fünf Ausscheidungsprodukte extrahiert, von denen drei – in der Tabelle 1 nicht aufgeführt – nicht identifiziert werden konnten. Sie ergaben bei der Dünnschichtchromatographie mit Reagenz 2 und Nachbehandlung mit Reagenz 4 eine orange Färbung. Diese Substanzen lagen in sehr kleinen Mengen vor.

Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, daß fünf Ausscheidungsprodukte erst nach Säurespaltung extrahierbar waren.

Die für die verschiedenen Substanzen angewandten chromatographischen Bedingungen sind aus Tabelle 2 zu entnehmen.

Die einzigen Verbindungen, die ohne Hydrolyse erhalten wurden, waren: Mephenoxalone und Metabolit I. Letzterer konnte durch den dünnschichtchromatographischen Vergleich und durch den Vergleich der UV-, IR-, Massen- und ¹H-NMR-Spektren mit denen des authentischen Materials als *o*-Methoxyphenol (Guajakol) identifiziert werden.

Tab. 1. Extraktion von Mephenoxalone und seinen Ausscheidungsprodukten aus dem Harn. I = vor Hydrolyse, II = nach Säurespaltung. 1 und 4 = Extraktion bei pH = 1-2; 2 und 5 = pH 13-14; 3 und 6 = pH 7. Extraktionsmittel: Chloroform.

Substanz	Extrakte					
	I			II		
	1	2	3	4	5	6
Mephenoxalone	x					
Metabolit I	x					
Metabolit II*	-	-	-	-	-	-
Metabolit III				x		
Metabolit IV					x	
Metabolit V					x	
Metabolit VI				x		x
Metabolit VII				x	x	

* wurde nicht direkt nachgewiesen

Tab. 2. Fließmittel und Nachweisreaktionen von Mephenoxalone und seinen Ausscheidungsprodukten bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel PF₂₅₄₊₃₆₆-Schichten.

Substanz	Reagenz				Fließmittel				
	1	2	3	4	A	B	C	D	E
Mephenoxalone	hellbraun	orange*							x
Metabolit I			braun	braunrot	x				
Metabolit II**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolit III			rot		x	x			
Metabolit IV	braun							x	
Metabolit V	braun								x
Metabolit VI		orange*	braun		x	x			
Metabolit VII	braun							x	

* bei Nachbehandlung mit 4

** wurde nicht direkt nachgewiesen

Das Auffinden von *o*-Methoxyphenol ließ vermuten, daß Mephenoxalone ebenso wie Metaxalone (5-(3,5-Xylyloxy-methyl)-oxazolidin-2-on) durch Spaltung der Ätherbindung in Stellung 5 abgebaut wird (10).

In Anlehnung an die Untersuchungen mit Metaxalone wurde eine Harnprobe nach Einnahme von Mephenoxalone alkalisch hydroxyliert; aus dem hydrolysierten Harn wurde bei alkalischer Reaktion eine Substanz extrahiert, die sich dünnschichtchromatographisch (hellgrüne

Färbung mit den Reagenzien 1 und 2; Fließmittel C) mit 3-Amino-1,2-propandiol (IIa) identisch verhielt. Die UV- und IR-Spektren der isolierten Substanz waren mit denen des authentischen Materials auch identisch. Substanz IIa wurde in dem gleichbehandelten medikamentenfreien Harn nicht gefunden. Aus diesem Befund kann geschlossen werden, daß 5-(Hydroxymethyl)-2-oxazolidon ein weiterer Metabolit (Metabolit II) des Mephenoxalone ist.

Metabolit III ergab in Methanol ein Absorptionsmaximum bei 284 nm und nach Zusatz von NaOH ein Absorptionsmaximum bei 295 nm. Das IR-Spektrum zeigte charakteristische Absorptionsbanden bei 3600-2700 cm⁻¹ (OH und NH), 1735 cm⁻¹ (C=O), 1595 und 1505 cm⁻¹ (C=C-arom.). Metabolit III hat die massenspektrometrisch bestimmte Summenformel C₁₁H₁₃NO₅ (M^r m/e 239; 100% rel. Intensität) und besitzt somit ein O-Atom mehr als Mephenoxalone. Dieses O-Atom ist offensichtlich im aromatischen Ring lokalisiert, wie das Massenspektrum zeigt. Das dem Peak m/e 124 bei Mephenoxalone entsprechende Phenolfragment ist hier nach m/e 140 (74% rel. Int.) verschoben und besitzt, wie durch Hochauflösung sichergestellt wurde, die Elementarzusammensetzung C₇H₈O₃. Durch Abspaltung von CH₃ entsteht daraus das Ion m/e 125 (62% rel. Int.). Weitere Hinweise auf das Vorliegen einer phenolischen OH-Gruppe in Metabolit III liefern die Reaktion mit Echtblausalz B und die bathochrome und hyperchrome Verschiebung des Absorptionsmaximums in alkalischer Lösung. Für diese Substanz wurde die Strukturformel „Metabolit III“ abgeleitet; die Stellung der OH-Gruppe konnte nicht ermittelt werden.

Das UV-Spektrum von Metabolit IV zeigte in Methanol ein Absorptionsmaximum bei 276-277 nm; nach Zugabe von NaOH bei 291-292 nm. Im IR-Spektrum fanden sich starke Banden bei 3400 cm⁻¹ (OH und NH), 3045 cm⁻¹ (C-H-Aromat), 1800 und 1735 cm⁻¹ (C=O) sowie 1602, 1592 und 1500 cm⁻¹ (C=C-Aromat). Die bei Mephenoxalone bei 2840 cm⁻¹ (O-CH₃) auftretende Bande fehlte im IR-Spektrum des Metaboliten IV.

Die Summenformel von Metabolit IV wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie zu C₁₀H₁₁NO₄ bestimmt. Das Massenspektrum dieser Substanz (Abb. 1a) weist gegenüber dem von Mephenoxalone (Abb. 1b) charakteristische Unterschiede auf, die möglicherweise auf die Anwesenheit einer freien OH-Gruppe in ortho-Stellung zur -O-CH₂-Gruppe zurückzuführen sind. Während Mephenoxalone als einzig wichtige Primär-Fragmentierung die unter Wasserstoff-Umlagerung verlaufende Bildung des ortho-Methoxyphenol-Ions (m/e 124) aufweist, werden bei Metabolit IV auch Bindungsspaltungen am Fünfring beobachtet. So liefert die Abspaltung von CO₂ aus dem Fünfring das Ion m/e 165, welches anschließend unter Verlust von NH₃ bzw. CH₂=NH die Ionen m/e 148 und m/e 136 liefert. Das Fragment m/e 136 spaltet dann ein H-Atom oder ein Methylradikal ab und gibt so die Ionen m/e 135 bzw. m/e 121. Durch eine wie beim Mephen-

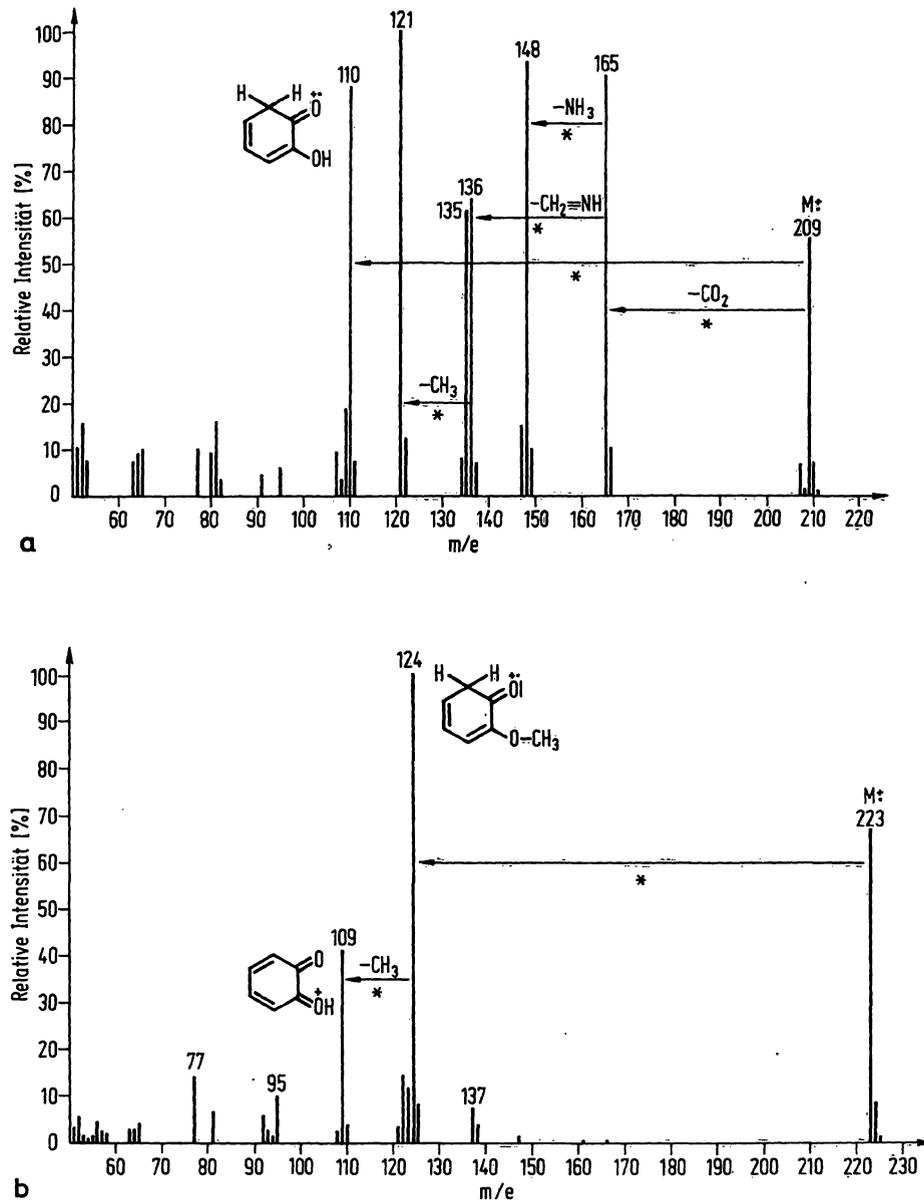


Abb. 1. Massenspektrum von Metabolit IV (a) und Mephenoxalone (b).

oxalone verlaufende Wasserstoff-Umlagerung und Spaltung der Ätherbindung entsteht dann das Ion m/e 110.

In dem in Dimethylsulfoxid-d₆ aufgenommenen ¹H-NMR-Spektrum erkennt man bei δ 9.06 und δ 7.54 zwei Singulets, die bei Zugabe von Deuteromethanol verschwinden und der phenolischen OH- bzw. der Amid-NH-Gruppe zugeordnet werden. Die aromatischen Protonen liefern ein Multiplett bei δ 6.6–7.0, das Proton am C-5 ein Multiplett bei δ 4.92. Das Dublett der O-CH₂-Gruppe (J = 4.4 Hz) liegt bei δ 4.10, die Protonen am C-4 erscheinen als Multiplett bei δ 3.50, in Deuteromethanol als AB-Teil eines ABX-Spektrums (J_{AB} = 9 Hz).

Metabolit IV wurde mit ätherischer Diazomethanlösung methyliert. Das erhaltene Produkt erwies sich dünn-schichtchromatographisch sowie UV-, IR- und massen-

spektrometrisch als identisch mit Mephenoxalone, womit die Struktur dieses Metaboliten IV als Desmethyl-Mephenoxalone bewiesen ist.

Das UV-Spektrum von Metabolit V zeigte in Methanol ein Absorptionsmaximum bei 275 nm. Im IR traten starke charakteristische Banden bei 3355, 3290, 3240 cm⁻¹ (OH und NH) und eine breite Absorption zwischen 3180 und 2250 cm⁻¹ auf; ferner 2835 cm⁻¹ (O-CH₃) und die Aromatenbanden (C = C) bei 1608, 1586 und 1500 cm⁻¹.

Das in Dimethylsulfoxid-d₆ aufgenommene ¹H-NMR-Spektrum von Metabolit V zeigt bei δ = 3.82 ein Singulett – entsprechend drei Protonen für die O-CH₃-Gruppe und bei δ = 7.00 ein Singulett für die vier Aromaten-Protonen. Die übrigen Protonen liefern breite, nicht aufgelöste Absorptionssignale zwischen 2.60 und 5.00 ppm.

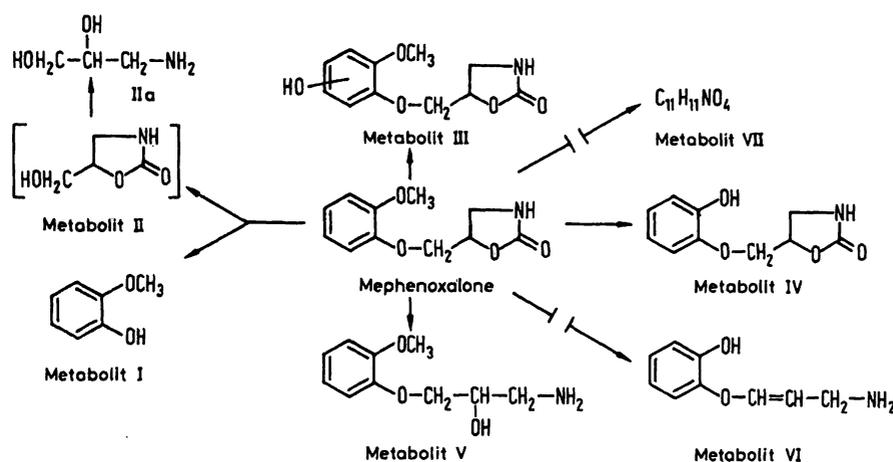


Abb. 2. Biotransformation von Mephenoxalone (Control-OM).

MS: M^+ m/e 197 ($C_{10}H_{15}NO_3^+$; 12% rel. Intens.), m/e 124 ($C_7H_8O_2^+$; 100% rel. Intens.), m/e 109 ($C_6H_5O_2^+$; 20% rel. Intens.), m/e 30 (CH_4N^+ ; 24% rel. Intens.).

Durch Umsetzung mit Acetanhydrid/Pyridin wurde Metabolit V in ein Diacetat überführt (MS: M^+ m/e 281). Metabolit VI ergab in Methanol ein Absorptionsmaximum bei 277 nm. NMR- und IR-Spektren konnten aufgrund der sehr geringen Substanzmengen nicht aufgenommen werden.

MS: M^+ m/e 165 ($C_9H_{11}NO_2^+$; 36% rel. Intens.), m/e 148 ($C_9H_8O_2^+$; 12% rel. Intens.), m/e 136 ($C_8H_8O_2^+$; 26% rel. Intens.), m/e 121 ($C_7H_5O_2^+$; 34% rel. Intens.), m/e 30 (CH_4N^+ ; 100% rel. Intens.). Als wahrscheinlichste wird für diese Struktur „Metabolit VI“ angenommen; allerdings kommt für die Doppelbindung auch die Stellung 2–3 in Betracht.

Metabolit VII zeigte in Methanol ein Absorptionsmaximum bei 280 nm; beim Zusatz von Natronlauge keine Verschiebung. Das IR-Spektrum ergab Absorptionen bei 3365 cm^{-1} (NH), $3015\text{--}2930\text{ cm}^{-1}$ (C-H- arom. und aliph.), 2850 cm^{-1} (O-CH₃), 1760 cm^{-1} (C=O), und $1605, 1590$ und 1490 cm^{-1} (C=C-Aromat).

Die Elementarzusammensetzung von Metabolit VII ergab sich mittels hochauflösender Massenspektrometrie zu $C_{11}H_{11}NO_4$. Die Verbindung besitzt somit zwei Wasserstoff-Atome weniger als die Ausgangssubstanz. Durch H-D-Austausch im Massenspektrometer wurde die Anwesenheit eines austauschbaren Wasserstoff-Atoms bewiesen. Das Massenspektrum ist durch einen sehr intensiven Molekülpeak (100% rel. Intens.) und wenig intensive Fragmentpeaks gekennzeichnet. Insbesondere

fehlt das bei den bisher untersuchten Substanzen immer gefundene charakteristische Phenolfragment; stattdessen wird als einziges Bruchstück ionen nennenswerter Intensität das Fragment $[M-CH_3CO]^+$ beobachtet.

Die Metaboliten III, IV, V, VI und VII wurden nicht frei, sondern konjugiert ausgeschieden. Die Substanzen III, IV und VII konnten sowohl nach Hydrolyse mit Salzsäure als auch nach Fällung der Konjugate und deren Spaltung mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase nachgewiesen werden, während die Verbindungen V und VI nur nach Säurespaltung nachweisbar waren. Möglicherweise war die für die enzymatische Spaltung angesetzte Harnmenge zu gering für den Nachweis dieser Substanzen; vorläufig jedoch wird man nicht sicher ausschließen können, daß es sich – zumindest bei Substanz VI – um ein Artefakt handeln kann.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen lassen sich bei der Biotransformation von Mephenoxalone, wie Abbildung 2 zeigt, verschiedene Wege erkennen:

1. Spaltung der Phenoxyethyl-Ätherbindung
2. Hydroxylierung des Benzolringes
3. Demethylierung
4. Öffnung des Oxazolidon-Ringes

Danksagung

Dem Verband der Chemischen Industrie e. V., Fonds der Chemischen Industrie, danken wir für die gewährte Unterstützung.

Literatur

1. Laboratoires OM S. A., Mephenoxalone (OM 518/Control-OMR), wissenschaftl. Broschüre.
2. Morrison, J. A. (1965), Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 157, 385-399.
- 3a. Kato, K., Yoshida, K. & Tsukamoto, H. (1962), Chem. Pharm. Bull. 10, 1242-1249.
- 3b. Kato, K., Yoshida, K., Tatsumi, K. & Tsukamoto, H. (1962), Chem. Pharm. Bull. 10, 1238-1242.
4. Stahl, E. (1967), Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
5. Auterhoff, H. & Kovar, K. A. (1973), Identifizierung von Arzneistoffen, Wiss. Verlagsges., Stuttgart.
6. Clarke, E. G. C. (1969), Isolation and Identification of Drugs, The Pharmaceutical Press, London.
7. Breiter, J. (1974), Kontakte (Merck) Heft 3, 17-24.
8. Merck, E. (1972), Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Darmstadt.
9. Wotschokowsky, M. (1975), Kontakte (Merck) Heft 1, 14-22.
10. Bruce, R. B., Turnbull, L. Newman, J. & Pitts, J. (1966), J. Med. Chem. 9, 286-288.

Prof. Dr. S. Goenechea
Institut für Gerichtliche
Medizin der Univ. Bonn
Stiftsplatz 12
D-5300 Bonn