

Die Vitali-Reaktion zur Erkennung der Tropa-Alkaloide

Myung Eun Su

Kyung Hee Universität, Institut für Pharmazie, Seoul, Korea

Tropane alkaloid를 확인하는 Vitali반응에 관한연구

徐 明 殷

경희대학교 약학대학

The identification methods for tropane alkaloids so far known were limited on tropic acid esters such as atropine and was unable to detect mandelic acid esters such as homatropine. The present method employing thin-layer chromatography was able to detect violet coloration developed with any of them by Vitali-reaction. It was established that this violet coloration is due to the mesomerization of carb-anion in the alkaline solution.

Im Jahre 1880 veröffentlichte D. VITALI¹⁾ eine empfindliche Farbreaktion, die es gestattet, die Solanaceenalkaloide Atropin und Hyoscyamin (früheres "Daturin") zu erkennen. Bemerkenswert ist die Reaktion deshalb, weil sie spezifisch zu sein scheint, d.h. von keinem anderen der wichtigeren Alkaloide gegeben wird.

Die Reaktion wird so ausgeführt, daß man das Atropin bzw. ein Atropinsalz mit rauchender Salpetersäure versetzt, das Gemisch auf dem Wasserbad eintrocknet und nach dem Erkalten mit alkoholischer Kalilauge befeuchtet. Bei Vorhandensein der Tropaalkaloide tritt eine violette Färbung auf, die je nach der Stärke der Nitrierung schon bald oder verzögert in ein schönes Rot übergeht. Nur die violette Farbe kann jedoch als charakteristisch angesehen werden, da z.B. auch Strychnin bei der gleichen Behandlung eine Rotfärbung zeigt.

Mit den chemischen Vorgängen der Vitali-Reaktion befaßten sich HARDY²⁾ und van URK³⁾. Nach HARDY geben Ester von Säuren, die der Tropasäure [α -phenyl α -hydroxymethylsäure $C_6H_5CH(C-$

$H_2OH)-COOH$] nahestehen, die Vitali-Reaktion, gleichgültig ob ein Ester des Tropins, Scopolins, Ekgonins oder eines beliebigen Alkohols vorliegt. Vorbedingung ist nach HARDY²⁾, daß im Säurerest die Gruppe $C_6H_5CH=$ oder nach von URK³⁾ die Gruppe $C_6H_5CH(C\equiv)COO^-$ vorhanden ist.

Hierzu ist zu bemerken, daß diese Gruppe durch Salpetersäure oxydierbar sein und die gesamte Säure in *p*-Nitrobenzoesäure überführbar sein muß. Ausschlaggebend für den Eintritt der Reaktion ist jedenfalls bei den Esteralkaloiden der Solanaceen der S ä u r e a n t e i l. Der Alkoholanteil der Alkaloide ist an der Farbentstehung unbeteiligt, auch das Tropin (Tropanol). Diese Tatsache ist jedoch weder den Kommentaren der Arzneibücher noch den Lehrbüchern zu entnehmen.

Nach dem DAB (Deutsche Arznei Buch) wird die Vitali-Probe folgendermaßen ausgeführt:

DAB—VI (1953) 43 (Neudruck), DAB—VII (1966) 85.

Auch W. AWE und Mitarbeiter haben die Vitali-Reaktion als Nachweis für die —Ester der Tropasäure darstellenden— Tropan-Alkaloide untersu-

cht⁴⁾ und die als Arzneimittel im Handel befindlichen synthetischen Mandelsäure-Ester des Tropans einbezogen.

Hierzu sei bemerkt, daß das in vielen Arzneibüchern angeführte, aus Tropin und Mandelsäure synthetisch erhaltene Homatropin, also der Tropanolester der Mandelsäure (Phenylglykolsäure: $C_6H_5CH(OH)COOH$) diese Reaktion nach bisherigen Literaturangaben, auch der Arzneibücher, nicht gibt, obwohl hier die von HARDY bzw. von van URK im Säureanteil geforderte Gruppierung vorliegt.

Man verwendet die Vitali-Reaktion bei Homatropin als Reinheitsprüfung, um naturelle Tropanolester (Hyoscyamin, Atropin) auszuschließen; z.B. heißt es im Kommentar zur Pharmacopoea Helvetica V:

Die bei der Vitali-Reaktion (Eindampfen mit konz. Salpetersäure und Zusatz von weing. Kalilauge) auftretende Violettfärbung ist charakteristisch für die Solanaceenalkaloide (Hyoscyamin, Atropin, Scopolamin); dagegen gibt Homatropin eine gelbe Färbung.

Auch mit Euphtalmin, das ebenfalls die Phenylglykolsäure enthält, soll die Reaktion in dieser Hinsicht negativ verlaufen. Wie diese Diskrepanz überbrückt werden kann, wird weiter unten gezeigt werden.

MORIN⁵⁾ hat eine Verbesserung des Verfahrens dadurch erzielt, daß der Reaktionsrückstand in Aceton gelöst wird, bevor der Zusatz von Lauge erfolgt. Diese Modifikation gestattet, abgesehen von der dabei erhöhten Empfindlichkeit der Reaktion, den Reaktionsverlauf deutlicher zu beobachten, da die violette Farbe länger anhält.

In allen ist es vorteilhaft, den Abdampfrückstand in Aceton zu lösen und statt mit alkoholischer Kalilauge nach EL-SHIBINI⁶⁾ mit einer 5%igen methanolischen Tetramethylammoniumhydroxydlösung zu prüfen, wenn man mit dem Abdampfrückstand eine photometrische quantitative Bestimm-

ung ausführen will. Die Farbintensität bleibt dann über 6~8 Minuten bestehen und kann bei $570m\mu$ gemessen werden. Diese abgewandelte Methodik ermöglicht eine photometrische Bestimmung.

W. AWE und Mitarbeiter stellten weiterhin fest, daß durch rauchende Salpetersäure und in vorteilhafter Ergänzung das Gemisch aus rauchender Salpetersäure und Acetanhydrid Atropin und der Mandelsäure-Ester des Homatropins darin zeigt sich die erfolgreiche Ergänzung zu 3,5-Dinitrobenzoesäure oxydiert werden.

SCHWENKER⁷⁾ deutete neuerdings die Bildung der farbigen Reaktionsprodukte. Nach seinen Arbeiten setzt die Entstehung dieser farbigen als Vitali-Reaktion bekannten Stoffe die Hydrolyse der Tropinester nicht voraus, sondern es wird ein farbiges $C_{ARB-ANION}$ des 4-Nitroatropins gebildet, aus dem 4-Nitroapo-Atropin durch die β -Eliminierung entsteht.

Die Bezeichnung dieser Verbindungen als *p*-Nitro-Atropin bzw. -Apoatropin ist nicht gerade glücklich.

Diese Arbeit war darauf angelegt, den Reaktionsmechanismus der Vitali-Reaktion zu klären. Nachdem dies SCHWENKER im Jahre 1964 weitgehend gelungen ist, wurden die weiteren Untersuchungen darauf ausgerichtet, die beim Studium der Nitrierungsreaktionen gewonnenen Erkenntnisse weiter auszubauen und das Verhalten der bereits in den Untersuchungskreis einbezogenen und weitere der Tropensäure ähnlichen Säuren vergleichend zu untersuchen.

Alle früheren Versuche zur Vitali-Reaktion erfolgten in einer Abdampfschale, und auch die Anfangsversuche dieser Arbeit wurden mit sehr kleinen Mengen vorgenommen. Dabei fiel aber der unterschiedliche Verlauf auf.

Aus den dabei erhaltenen Rückständen war das Endprodukt sehr schwierig zu isolieren und auch das violette Reaktionsprodukt war aus einem Säure-

lenchromatogramm mit Methanol schwierig zu erhalten. Die Kristalle dieser violetten Substanz verflüssigten sich schon auf dem Filter während des Auswaschens.

Für weitere Untersuchungen wurden daher größere Mengen an Ausgangssubstanz eingesetzt und der Umsatz bei gleicher Temperatur, bei der sich die Reaktion zur Identitätsprüfung der Belladonna-Alkaloide vollzieht, im Erlenmeyerkolben durchgeführt.

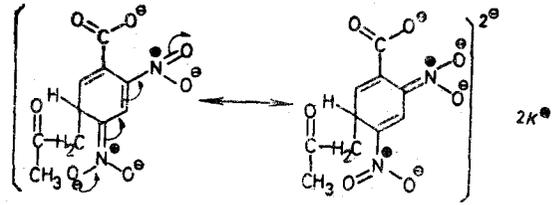
Erweiterte Vorversuche und Betrachtung zur Vitali-Reaktion und Farbbildung (Farbkomplexe)

Es ist bekannt⁸⁾, daß *m*-Dinitrobenzol mit Aceton und Lauge eine Violettfärbung ergibt, und daß Nitroderivate mit Ketonen, Aldehyden oder anderen Verbindungen mit einer aktivierten Methylgruppe Rot- oder Violettfärbung ergeben.

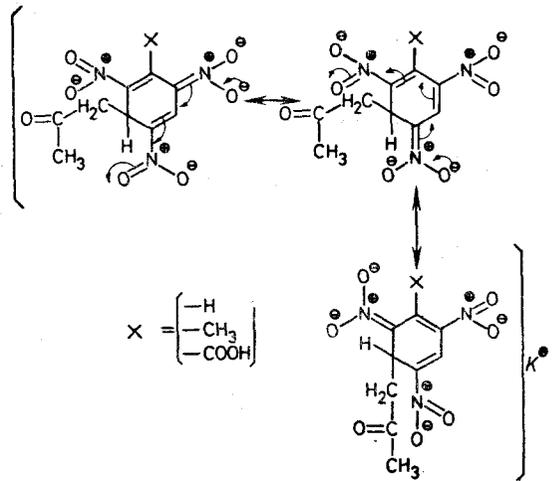
Nach unseren Untersuchungen an aromatischen Nitroderivaten in verschiedenen Lösungsmitteln konnten wir feststellen, daß die mono-Nitroderivate von Benzol, Benzoesäure und Toluol mit Lauge und Aceton keine Violettfärbung, die Dinitroderivate der genannten Verbindungen eine Blauviolett- und die entsprechenden Trinitroverbindungen eine Rotfärbung zeigen.

CANBACK⁹⁾ berichtet über den Reaktionsmechanismus zwischen *m*-Nitrobenzol und Verbindungen mit aktivierter Methylgruppe. Nach neuer Ansicht sollen folgende Grundannahmen das Auftreten der Färbungen erklären: in der alkalischen Lösung erfolgt eine Protonabspaltung aus der Methylenverbindung; diese Dissoziation kann langsam erfolgen, es entsteht dabei ein resonanzfähiges Anion der allgemeinen Form $(X=Y-Z \leftrightarrow X-Y=Z)$. Dieses Anion lagert sich mit einer polaren Form von *m*-Dinitro-Benzol zu einem komplexen Ion um.

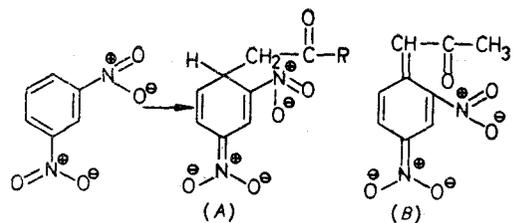
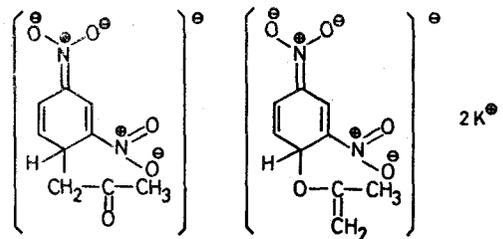
Theoretisch sollte dieser Komplex unter Abspaltung eines Hydridions bei Aceton in 2,4-Dinitrophenylaceton bzw. 2,4-Dinitrophenylisopro-



2,4-Dinitrobenzoesäure



2,4,6-Trinitro-Benzol-Toluol- und Benzoesäure



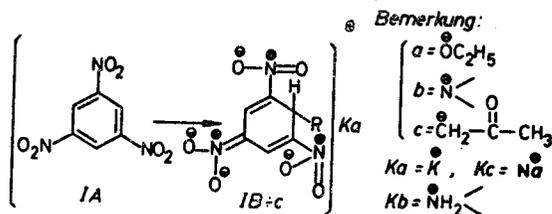
penaether übergehen können; aber diese Verbindungen wurden von CANBACK nicht aufgefunden.

Als zweites Beispiel für die schon lange als "Janovski-Zimmerman-Reaktion" bekannte Violett färbung von *m*-Dinitrobenzol und seinen Derivaten mit CH-aciden Verbindungen in Gegenwart von Alkalien sei die Bildung der folgenden A-Form aus *m*-Dinitrobenzol und einem Keton formuliert.

Neuere Untersuchungen¹⁰ ergaben, daß bei derartigen Umsetzungen auch die Dehydrierungsprodukte B entstehen.

Als Oxydationsmittel wirkt dabei ein Teil der Nitroverbindungen. Nach R. FOSTER und R.K. MACKIE ist es vom Lösungsmittel abhängig, ob A oder B entsteht¹¹

Nach den grundlegenden Untersuchungen von J. MEISENHEIMER¹², die später ergänzt wurden, reagiert 1,3,5-Trinitrobenzol mit Kaliumaethylat zu einem Addukt der Struktur I A¹³.



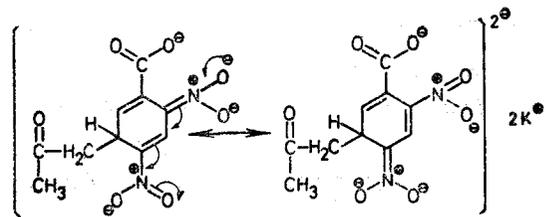
Auch CH-acide Verbindungen lagern sich bei Gegenwart von Alkalien an die aromatischen Polynitroverbindungen an; so entsteht aus A und Aceton das Addukt B-c^{14,51}.

Wir ließen verschiedene Dinitrobenzoesäuren mit KOH-Lösung und Aceton reagieren. Dabei gab 2,5-Dinitrobenzoesäure keine Färbung, während die 2,4-, 2,6-, 3,4- und die 3,5-Dinitrobenzoesäure Blauviolett färbungen zeigten.

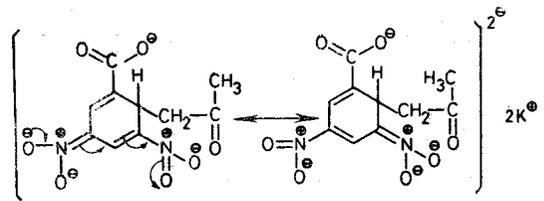
Diese Reaktionsweise erklären wir folgendermaßen:
 Das Carbanion $\text{H}_3\text{C} - (\text{CO} =) \text{C}^- \text{H}_2$ substituiert den Benzolring nukleophil.

Bei der "2,5-Dinitrobenzoesäure" ist die *p*-Stellung zur ersten NO_2 -Gruppe durch die zweite

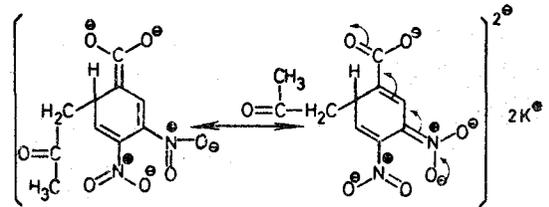
Nitrogruppe am C_5 besetzt.



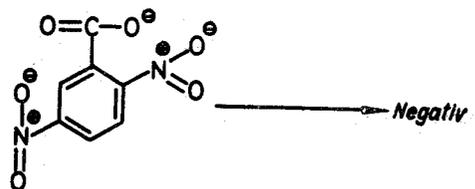
2,4-Dinitrobenzoesäure



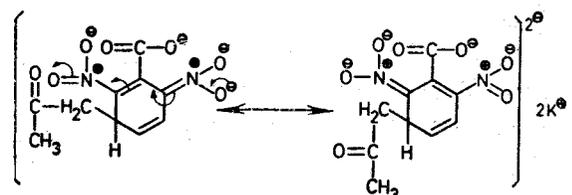
3,5-Dinitrobenzoesäure



3,4-Dinitrobenzoesäure



2,5-Dinitrobenzoesäure



2,6-Dinitrobenzoesäure

Die Elektronenbrücke für die nukleophile Substitution läßt sich in *p*-Stellung zur ersten Nitrogruppe nur bei den 2,4-, 2,6-, 3,4-, 3,5-Dinitrobenzoesäuren formulieren, so daß es also auch nur in diesen Fällen zu einer Substitution am Benzolring durch Aceton kommen kann. Außerdem lassen sich bei diesen Dinitrobenzoesäuren zur Erklärung der Färbung zwanglos verschiedene mesomere Strukturen formulieren, während bei der 2,5-Dinitrobenzoesäure dies N i c h t möglich ist.

Experimenteller Teil

Einzelheiten über die Durchführung der Vitali-Reaktion für Tropan-Alkaloide und verschiedene tropasäureähnliche Phenylderivate nebst Variationen der Methodik :

1. Untersuchungen der Reaktionen in der Abdampfschale

a) Traditionelle Methode nach Vitali:

Auf dem Wasserbad wurde die Substanz mit wenig rauchender Salpetersäure in einer Abdampfschale bis zur Trockne eingedampft. Dann wurde der Rückstand mit einigen Tropfen alkoholischer Kalilauge (DAB VI) versetzt. Es entstand eine Violettfärbung, die im Laufe von 3~5 Minuten in Rot übergang.

b) Abänderung der Methodik nach Shibini :

Die Vorschrift entspricht der alten Methode nach Vitali, aber hier werden erst 5ml rauchende Salpetersäure als Oxydationsmittel und dann 3ml Acetanhydrid hinzugesetzt, im übrigen wie oben verfahren.

TABELLE I Ergebnisse der Reaktion nach Vitali-Shibini und eigene Ergänzungs Methodik

Substanz	Reagenz	r. HNO ₃		r. HNO ₃ +HAC		r. HNO ₃ /30%H ₂ O ₂	
		r. HNO ₃	—	r. HNO ₃ HAC	##	r. HNO ₃ 30%H ₂ O ₂	##
Atropin	k. 65%HNO ₃	(+)		65%HNO ₃ HAC	(+)	65%HNO ₃ 30%H ₂ O ₂	##
	45% "	##		45% "	—	45% " "	##
	25% "	—		25% "	—	25% " "	##
Homatropin	r. HNO ₃	—		r. HNO ₃ HAC	##	r. HNO ₃ 30%H ₂ O ₂	##
	65%HNO ₃	(+)		65%HNO ₃ HAC	##	65%HNO ₃ 30%H ₂ O ₂	+
	45% "	+		45% "	##	45% " "	+
	20% "	##		20% "	+	20% " "	+
Mandelsäure	r. HNO ₃	##		r. HNO ₃ HAC	+	r. HNO ₃ 30%H ₂ O ₂	—
Acetylmandelsäure	"	##		"	+	"	—
Mandelsäurebenzylester	"	(+)		"	##	"	##
Mandelsäurechlorid	"	##		"	+	"	—
Tropasäure	"	##		"	(+)	"	(+)
Tropasäthylester	"	—		"	##	"	##
Cocain	"	(+)		"	(+)	"	(+)
Benzoessäure	"	—		"	##	"	(+)
Benzilsäure	"	(+)		"	##	25%HNO ₃ 30%H ₂ O ₂	—
Phenylbrenztraubensäure	"	(+)		"	+	r. HNO ₃ 30%H ₂ O ₂	+
Buscopan ^R	"	##		"	##	"	##
Scopalamin	"	##		"	##	"	##
Phenylalanin	"	##		"	##	"	+
Tropasäurebutylester	"	+		"	##	"	##

Kein Violet Reaktion —, Sehrschwach " (+), Wenig " +,
 Stark Violet Reaktion ##, Sehr stark " ##

c) Eigener Versuch (Variation): Einsatz anderer Oxydationsmittel

Die Arbeitsmethode ist gleich der Vitalivorschrift, aber wir setzten als Oxydationsmittel konzentriertes Wasserstoffperoxyd und andere Oxydationsmittel ein.

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Variation der Vitalireaktion bei Einsatz verschiedener Oxydationsmittel zusammengestellt. Es ist zu beobachten, daß die Säureester (z.B. Atropin, Homatropin, Buscopan, Scopolamin, Tropasäureester) mit rauchender Salpetersäure und anderen Oxydationsmittel reagieren.

Im Gegensatz reagierten die Säuren (z.B. Tropasäure, Mandelsäure, Benzilsäure...) mit rauchender Salpetersäure besser, d.h. ohne weiteren Zusatz.

Hierbei läßt sich erkennen, daß die Säureester bei höheren Temperaturen (über 80°) und die Säuren bei niedrigeren Temperaturen (unter 80°) besser reagieren.

2. Untersuchungen auf der Dünnschichtplatte

Es wurde folgendermaßen gearbeitet.

Isolierung der Basen aus dem Salz:

0.5g Substanz wurde in Wasser gelöst, mit Ammoniak alkalisiert und mit 100ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Methylenchlorid-phase

wurde vom Wasser abgetrennt und über Nacht mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Methylenchloridphase filtriert. Methylenchlorid wurde abdampft und der Rückstand aus verdünntem Alkohol umkristallisiert.

Arbeitsvorschrift für die Arbeiten auf der Platte:

Es wurden je 0,1; 0,01; 0,001mg Substanz in Methylenchlorid gelöst und auf Kiessigel-G-Dünnschichtplatten mit Kapillaren aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden die Dünnschichtplatten mit den noch folgenden Fließmitteln entwickelt. Die Laufstrecke betrug 15cm. Nach dem Trocknen wurde mit Dragendorff's Reagens detektiert. Die Nachweisgrenze lag bei 0,01mg. Die eingesetzte Substanz wurde ebenfalls nach der ursprünglichen Vitali-Reaktion auf der Platte mit konzentrierter Kalilauge detektiert. Nachweisgrenze lag bei 0,1mg.

Fließmittel :

- 1) Chloroform: Aceton: Diaethylamin (50:40:10)
- 2) Chloroform: Diaethylamin (90:10)
- 3) Cyclohexan: Chloroform: Diaethylamin (50:40:10)
- 4) Methanol: Aceton (50:50)
- 5) Methanol: Aceton: Triäthylamin (50:51:1,5)
- 6) Methanol (100)
- 7) Chloroform: Diaethylamin (95:5)
- 8) Chloroform: Diaethylamin (99:1)
- 9) Chloroform: Aceton (50:50)

TABELLE II

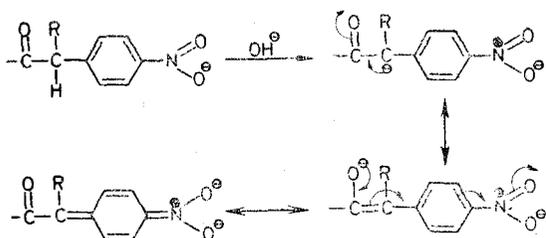
Ergebnisse auf der Dünnschichtplatte

Substanz	Dragendorff Reagenz	Alte Ausführung nach Vitali						Neue artige Ausführung nach Shibini						
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7
Atropin	+	+	++	###	###	###	###	+	++	++	++	###	###	###
Homatropin	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	++	###	###	###
Tropasäure	(+)	-	(+)	+	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-
Mandelsäure benzylester	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Mandelsäure	(+)	-	(+)	+	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-
Cocain	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Buscopan	+	+	++	###	###	###	###	+	++	++	++	++	###	###

Kein Violet Reaktion -, Sehr schwach Violet Reaktion (+), Wenig Violet Reaktion +,
Stark Violet Reaktion ++, Sehr stark Violet Reaktion ###

Wir erklären diese Ergebnisse damit, daß die Violettfärbung mit folgender Reaktion zusammenhängen muß.

Auf Grund dieser Ergebnisse nehmen wir an, daß die Violettfärbung durch das mesomeriestabilisierte Carbanion hervorgerufen wird.



Bei der Detektion mit konz. Kalilauge entstand die Violettfärbung wie beider Vitali-Reaktion sofort, verschwand aber nach kurzer Zeit. Dieses Verhalten scheint uns sehr stark für das Vorhandensein eines instabilen Zwischenproduktes zu sprechen. Die CH-acide Verbindung wird im basischen Milieu leicht in das mesomeriestabilisierte

Carbanion überführt. Sicher ist, daß die CH-Acidität des α -Wasserstoffs an der Gruppierung

$\text{NO}_2\text{-C}_6\text{H}_5\text{-CH-(C=O)}$ durch die -C=O Gruppe¹⁶⁾ und die Gegenwart des elektronenanziehenden Substituenten -NO_2 stärker erhöht wird. Die Ionisation der -C-H Bindung wird durch die Delokalisierung der negativen Ladung im entstandenen Anion begünstigt.

Die vorliegende Arbeit im Sommersemester 1963 im Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Braunschweig begonnen und im Sommersemester 1966 abgeschlossen.

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. W. Awe⁺

möchte ich an dieser Stelle für die mir zuteil gewordene vielseitige Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen, sowie für das stets rege Interesse am Fortgang dieser Arbeit herzlich danken.

An dieser Stelle möchte ich auch der Firma *Reemtsma* für ihre Hilfe herzlich danken.

국 문 초 록

지금까지의 tropane-alkaloid의 확인방법으로는 tropic acid의 ester계인 atropine 등등의 화합물에서만 가능하였었고 mandelic acid계인 homatropine 등에는 불가능하였었으나 Dünnschichtplatte를 통한 본실험에서는 그 어느것이든 Vitali 반응에서 오는 Violet색을 증명할 수 있었고 Violet색의 생성은 알칼리성용액중에서 일어나는 carb-anion의 mesomeri화라고 단정한다.

<1970. 4. 10. 접수>

Literature

- 1) D. VITALI, OROSI: *Zit. nach Z. analyt. Chem.* 563(1881)
- 2) P. HARDY: *J. de Pharm. et de Chem.* 26(1922)
- 3) H.W. VAN URK: *Chem. Weekblad* 169(1924)
- 4) M.E. KIM SI *et al*: *Naturwissenschaften* 540(1962)
- 5) C. MORIN: *J. de Pharm. et de Chem.* 545(1936)
- 6) EI-SHIBINI: *Dissertation TH Braunschweig* 1962
- 7) G. SCHWENKER: *Angew. Chem.* 608(1964)
Arch. Pharm. 826(1965)
- 8) T. SEVERIN *et al*: *Chem. Ber.* 468(1964)
- 9) T. CANBACK: *Svensk. Farmac. Tidskr.* 1(1950)
- 10) O. NEUNHOFFER, *et al*: *Z. Physiol. Chem.* 116 (1961); T. KING u. C.E. NEWAL: *J. Chem. Soc. (London)* 367(1962)
- 11) *Tetrahedron(London)* 1131(1962)
- 12) J. MEISENHEIMER: *Liebigs Ann. Chem.* 205(1902)
- 13) R. FOSTER u. R.K. MACKIE: *J. Chem. Soc. (London)* 3796
- 14) A. HANTZSCH u. N. PICTON: *Ber. dtsh. chem Ges.* 2219(1902)
- 15) M. KIMURA: *J. Pharm. Soc. Japan* 1219(1953)
- 16) H. SAUNDERS JR. and S. ASPERGER: *J. Amer. Chem Soc.* 1612(1957)