

CHROM. 7431

MÖGLICHKEITEN DER REAKTIONSCHROMATOGRAPHIE, DARGESTELLT AM BEISPIEL DES REAKTIONSCHROMATOGRAPHISCHEN NACHWEISES VON NITRAZEPAM (MOGADAN[®]) UND SEINER HAUPTMETABOLITEN

H. SCHÜTZ

Institut für Rechtsmedizin der Universität, Frankfurter Str. 58, D 6300 Giessen (B.R.D.)

(Eingegangen am 25. Januar 1974)

SUMMARY

Possibilities of reaction chromatography exemplified by the reaction-chromatographic detection of nitrazepam (Mogadan[®]) and its major metabolites

An analytical method for the detection of nitrazepam and its major metabolites is described. After separation in the first dimension of two-dimensional thin-layer chromatography, the substances are derivatized by treatment with an acidified aqueous solution of $TiCl_3$. By means of combined hydrolysis and reduction nitrazepam and its metabolites are converted on the plate to reproducible derivatives, following a scheme that is also reported. The subsequent separation in the second dimension permits exact identification by way of R_F values and Bratton-Marshall detection. Amounts as low as $0.02 \mu g$ can be detected. The article demonstrates the possibilities of reaction chromatography and aims to induce other applications.

EINLEITUNG

Nach dünn-schichtchromatographischen (DC) Trennungen liegen die zu untersuchenden Substanzen in der Regel unverändert vor und können als solche direkt auf der Platte nachgewiesen oder aus dem Sorbens eluiert werden. Eine Ausnahme bilden selbstverständlich Stoffe, die äusseren Einflüssen gegenüber labil sind und beispielsweise durch Licht, Wärme, Luftsauerstoff oder ungeeignete Fließmittel verändert werden.

Besonders bemerkenswert ist, dass zahlreiche sonst relativ inerte Substanzen im Chemisorpt, d.h. beispielsweise in der aktiven Trägerschicht des Sorptionsmittels DC-Systeme, zu Folgeprodukten reagieren können, die sich in vergleichbaren homogenen Lösungen nur langsam oder überhaupt nicht bilden. Wilk und Mitarbeiter¹⁻³ nehmen bei derartigen Reaktionen eine Beteiligung des Trägermaterials an der Bildung des Übergangszustandes an, wobei es durch die Chemisorption zu einer Veränderung der Energie des Grundzustandes kommen soll. Unsere eigenen Untersuchungen⁴ legen den Schluss nahe, dass sich bei Derivatisierungsreaktionen im Chemisorpt viele der

möglichen Produkte in vergleichbaren Ausbeuten bilden, während in homogenen Lösungen ein bestimmter, kinetisch oder thermodynamisch besonders begünstigter, Reaktionsverlauf bevorzugt ist.

Auf eine präparative Nutzung des vorstehend ausgeführten Sachverhaltes soll hier nicht näher eingegangen werden. Uns interessierte vielmehr die damit verbundene erhöhte analytische Aussagekraft. Die Anwendung auf zahlreiche, mit Hilfe der konventionellen DC oft nur unzureichend lösbare Trennprobleme bestätigte in allen Fällen die überraschend gute Brauchbarkeit der Methode.

PRINZIP DER REAKTIONSCHROMATOGRAPHIE

Vor der eigentlichen DC Trennung wird das Untersuchungsmaterial am Startpunkt mit Hilfe einer geeigneten Reaktion derivatisiert. Die hierbei entstandenen Folgeprodukte trennt man anschliessend durch Entwickeln der Platte. Falls die betreffende Substanz der gewählten Derivatisierungsreaktion zugänglich war, erhält man auf diese Weise ein "Derivatmuster", dessen analytischer Aussagewert erheblich über dem einer Trennung von Reinsubstanzen liegen kann. Oft ist diese Methode sogar der einzig gangbare Weg, um zu einer Unterscheidung eng verwandter Strukturen zu gelangen. Zur Derivatisierung ist grundsätzlich jede chemische Reaktion geeignet. Besonders nutzbringend sind jedoch Agentien hoher Selektivität. So wäre es zum Beispiel wenig sinnvoll, organische Substanzen mit Fluor zu behandeln, da hierbei das Substrat in der Regel völlig zerstört wird. Auf der Suche nach geeigneten Derivatisierungsreagenzien überprüften wir zahlreiche Möglichkeiten, z.B. Umsetzungen mit Chlor, Brom, Jod, Ozon, Stickstoffoxiden, Wasserstoffperoxid und photochemische Reaktionen unter UV-Bestrahlung.

BEISPIELE FÜR DIE ANWENDUNG DER REAKTIONSCHROMATOGRAPHIE

Besonders bewährte sich z.B. eine Bromierungsreaktion bei der Unterscheidung der Barbiturate^{5,6}. Wir konnten zeigen, dass gesättigte Barbiturate beim Begasen mit Brom am Startpunkt der Dünnschichtchromatogramme keiner Derivatisierung zugänglich sind, cyclisch ungesättigte Barbiturate maximal zwei Folgeprodukte und in der aliphatischen Seitenkette ungesättigte Vertreter dieser Stoffklasse drei oder mehr Derivate bilden, die sich dünnschichtchromatographisch gut differenzieren lassen. Auf diese Weise konnten viele der zur Zeit auf dem Arzneimittelmarkt befindlichen (etwa 27) Barbiturate in befriedigender Weise unterschieden werden.

Eine Bromierung am Startpunkt führte auch zu einer Unterscheidung der Pyrazolone Phenylbutazon und Prenazon⁷.

Oft führen schon einfache chemische Reaktionen zu einer empfindlichen Nachweismöglichkeit. Im Rahmen der Analyse zahlreicher Benzodiazepinderivate, die zur Zeit als Tranquilizer (z.B. Chlordiazepoxid (Librium[®]), Diazepam (Valium[®]), Nitrazepam (Mogadan[®]), Chlorazepate (Tranxilium[®]), Medazepam (Nobrium[®]), Oxazepam (Adumbran[®], Praxiten[®]), Lorazepam (Tavor[®]) und Clonazepam (Rivotril[®]) auf dem Arzneimittelmarkt sind, erzielten wir durch eine saure Hydrolyse auf dem Startpunkt der Dünnschichtchromatogramme eine hinreichende Derivatisierung, da die hierbei entstandenen substituierten Benzophenone in charakteristischer Weise mit Hilfe einer Diazotierung und anschliessender Kupplung⁸⁻¹⁰ bzw. andere

Bruchstücke wie zum Beispiel Glycin¹¹ äusserst empfindlich nachgewiesen werden können.

Eine Anwendung der Methode auf die Analytik der weit verbreiteten Pharmaka Phenacetin¹² und Aminopyrin¹³ (Pyramidon[®]) bzw. deren Metabolite sowie der Pestizide mit Nitrogruppen¹⁴ wurde ebenfalls mit Erfolg durchgeführt.

Über reaktionschromatographische Untersuchungen bei Arzneimitteln berichten auch Kofoed *et al.*¹⁵, De Zeeuw und Wijsbeek¹⁶ und Schmidt¹⁷.

Nachstehend soll über eine Methode berichtet werden, die es gestattet, Nitrazepam (Mogadan[®]) und seine Hauptmetaboliten durch Kopplung von saurer Hydrolyse und Reduktion mit Titan(III)chlorid als Derivatisierungsreaktionen sicher und empfindlich nachzuweisen.

BIOTRANSFORMATION VON NITRAZEPAM (MOGADAN[®])

Für die Biotransformation von Nitrazepam ist folgendes Stoffwechselschema (Fig. 1) anzunehmen¹⁸⁻²¹. Die genannten Autoren konnten zeigen, dass die Reduktion der Nitrogruppe und die Acetylierung Hauptmetabolisierungsschritte sind. Unverändertes Nitrazepam (1) sowie das Hydrolyseprodukt 2-Amino-5-nitrobenzophenon (5) treten lediglich als Nebenmetabolite auf.

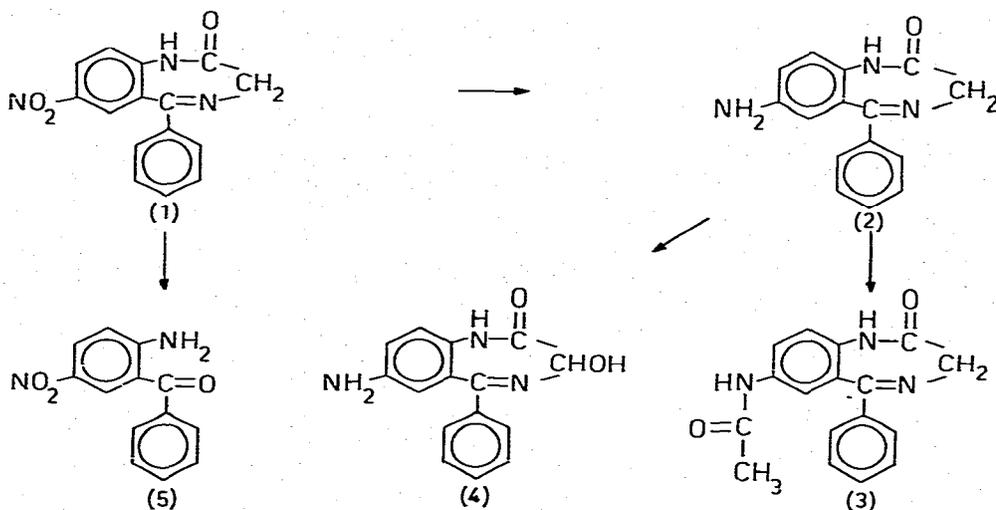


Fig. 1. Biotransformation von Nitrazepam (Mogadan[®]).

Mit dem Nachweis von Nitrazepam und seinen Stoffwechselprodukten befassen sich zahlreiche Arbeiten²²⁻²⁸.

Wichtigstes Untersuchungsverfahren ist die ein- bzw. zweidimensionale DC Trennung. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir zeigen, dass eine Kombination von saurer Hydrolyse und Reduktion im Sinne einer Reaktionschromatographie den Aussagewert und damit die Beweiskraft eines zweidimensionalen Dünnschichtchromatogrammes beträchtlich erweitern kann.

REAKTIONSSCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON NITRAZEPAM UND SEINEN HAUPTMETABOLITEN

Grundlagen

Wie eingangs erwähnt bilden sich nach unseren Beobachtungen bei Reaktionen auf dem Sorbens DC-Systeme viele der möglichen Derivate in vergleichbaren Ausbeuten. Setzt man die einzelnen Substanzen auf der Platte gleichzeitig einer sauren Hydrolyse und einer Reduktion aus, so erhält man nicht etwa nur ein reduziertes Hydrolyseprodukt, sondern neben der unveränderten auch noch die hydrolysierte bzw. die reduzierte Ausgangssubstanz, sofern diese der betreffenden Reaktion zugänglich ist.

Eine Ausnahme bildet lediglich der acetylierte Metabolit (3), bei dem die N-Acetyl-Gruppe so hydrolyselabil ist, dass die Hydrolyse zum primären aromatischen Amin (2) stets auch auf der Platte quantitativ verläuft.

Derivatbildung

In Fig. 2-5 sind die bei den einzelnen Substanzen des Stoffwechselschemas (Fig. 1) zu erwartenden Derivate dargestellt. Lediglich auf eine Erfassung des Metaboliten (4) wurde verzichtet, da diese Substanz nur in untergeordneten Konzentrationen auftritt und ausserdem als Konjugat (Bindung der Hydroxylgruppe an Glucuron- oder Schwefelsäure) bei den normalen Trennungsgängen ohne eine vorherige saure oder enzymatische Hydrolyse nicht erfasst wird²⁹.

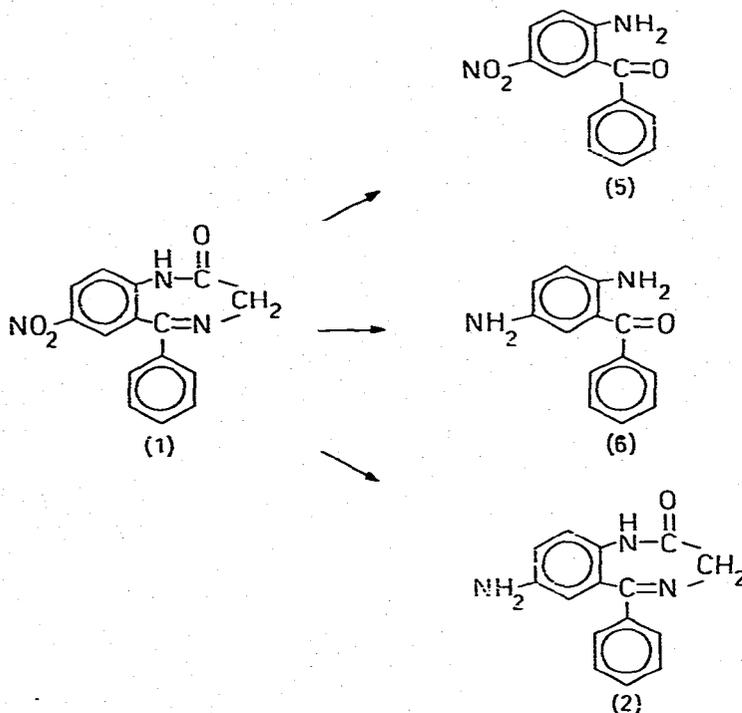


Fig. 2. Derivatisierungsschema von Nitrazepam (1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on).

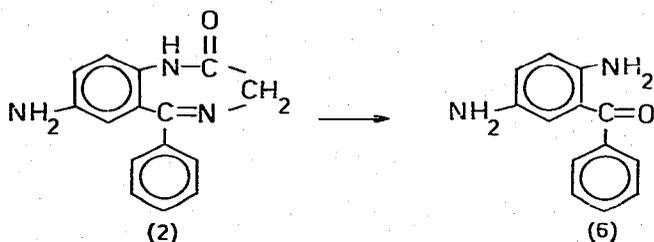


Fig. 3. Derivatisierungsschema von 7-Amino-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on.

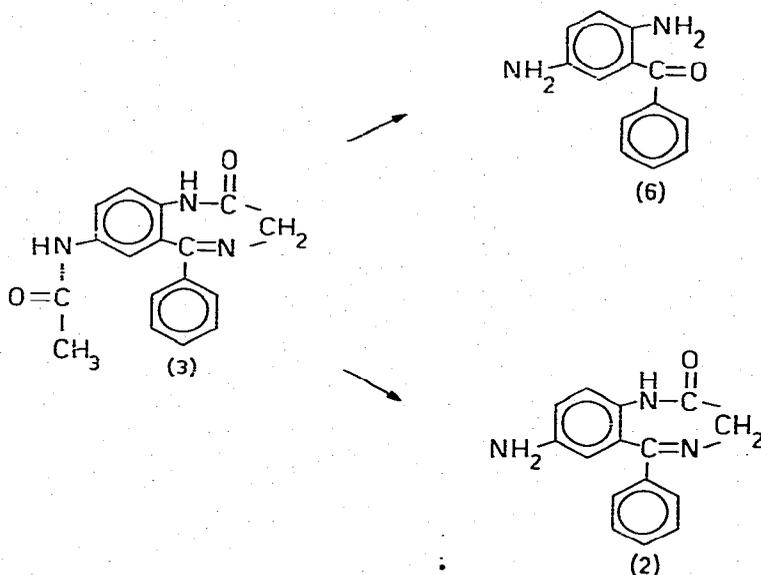


Fig. 4. Derivatisierungsschema von 7-Acetamido-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on.

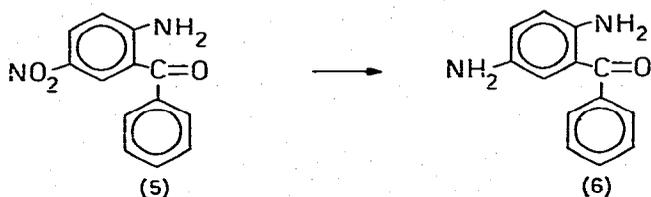


Fig. 5. Derivatisierungsschema von 2-Amino-5-nitrobenzophenon.

Praktische Durchführung

Präparation der Vergleichssubstanzen^{25,30,31}. Nitrazepam (Mogadan[®]), 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (1), dient als Ausgangsprodukt für die nachfolgend beschriebenen Synthesen und kann aus handelsüblichen Nitrazepam-Zubereitungen durch Extraktion gewonnen werden (Fp. 224–226°; eventuell aus Äthanol umkristallisieren).

7-Amino-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (2): Eine Lösung von 0,5 g Substanz (1) in 30 ml 50%igen Alkohols wird durch Zugabe von 1 g MgO alkalisiert (pH 10). Zur Reduktion wird nach einem weiteren Zusatz von 2 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ kräftig durchgeschüttelt und etwa 1 h auf dem Wasserbad bei 50° erwärmt. Nach dem Abkühlen erfolgt zunächst die Abtrennung der Hauptmenge an Äthanol durch Destillieren im Vakuumrotationsverdampfer. Die verbliebene wässrige Phase wird mit Methylenchlorid-Essigsäureäthylester (2:1) ausgeschüttelt, anschliessend engt man den abgetrennten organischen Extrakt ebenfalls im Rotationsverdampfer ein und kristallisiert aus Äthanol um (gelbe Kristalle; Fp. 237–239°).

7-Acetamino-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (3): Eine Lösung von 0,3 g Substanz (2) in 5 g Essigsäureanhydrid wird etwa 5 min auf 50–60° erwärmt und anschliessend in Eiswasser abgekühlt. Nach 1 h wird das Reaktionsprodukt abfiltriert und mit Äther ausgewaschen. Umkristallisieren aus Xylol-Dimethylformamid (9:1) ergibt farblose Kristalle (Fp. 272–274°).

2-Amino-5-nitrobenzophenon (5): Eine Lösung von 0,2 g Substanz (1) in 6 ml heissem Methanol wird nach Zusatz von 10 ml 2 N HCl unter Rückfluss auf dem Wasserbad (90°) etwa 24 h erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgt eine Abtrennung durch Filtrieren und Umkristallisieren aus Äthanol (Fp. 141°).

2,5-Diaminobenzophenon (6): Eine Lösung von 1,25 g Substanz (5) in 40 ml Methanol wird mit Palladium-Holzkohle katalytisch hydriert. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisieren aus Benzol gereinigt (Ausbeute 0,5 g; Fp. 140–142°).

Methodik der reaktionschromatographischen Trennung. Die Einteilung der DC-Platte* erfolgt in der für die zweidimensionale Methode üblichen Weise. Am Startpunkt des Hauptfeldes wird das zu untersuchende Material (z.B. Urinextrakt) aufgetragen. Auf den beiden Vergleichsfeldern N_1 und N_2 befinden sich die einzelnen Referenzsubstanzen (Nitrazepam und Metaboliten) ebenfalls auf der Startlinie. Die Platte wird nun in der ersten Laufrichtung mit dem Fließmittelsystem Benzol-Isopropanol-Ammoniak (25%) (80:20:1) entwickelt und anschliessend gründlich abgelüftet. Die Entwicklung in der ersten Dimension bewirkt sowohl eine Trennung der einzelnen Benzodiazepine bzw. Benzophenone als auch eine Abtrennung gegenüber den z.B. in Harnproben zahlreich vertretenen physiologischen Begleitsubstanzen, die aufgrund ihrer meist polarerer Strukturen in der Nähe des Startpunktes verbleiben.

Es folgt nun die eigentliche Derivatisierungsreaktion. Hierzu deckt man das Chromatogramm mit Glasplatten so zu, dass lediglich die in Fig. 7 schraffiert gezeichneten Kieselgelstreifen frei bleiben und sprüht diese Sektoren unter dem Abzug mit saurer Titan(III)chlorid-Lösung ein (Merck: Art. 808307). Dieses Reagens bewirkt nicht nur eine Reduktion, sondern auch eine Hydrolyse, wenn man das Chromatogramm anschliessend mit einem Glas gleicher Grösse bedeckt und im Trockenschrank etwa 10 min auf 100° erhitzt. Die Deckplatte wird nun entfernt und das Dünnschichtchromatogramm für weitere 5 min bei der angegebenen Temperatur belassen, um die überschüssige Feuchtigkeit zu entfernen. Danach stellt man die abgekühlte DC-Platte etwa 3 min in eine Kammer, die Ammoniakdämpfe enthält (Becher-

* Bei unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass die hierzu benutzten "DC-Fertigplatten Woelm Kieselgel" unter der Einwirkung der teilweise recht aggressiven Reagenzien keine Veränderungen der Trennqualität zeigten.

glas mit etwas 25%iger Ammoniaklösung auf dem Boden der Kammer), wobei die entstandenen Amine von der Salzform in die freien Basen überführt werden. Nach kurzem Ablüften folgt die Entwicklung in der zweiten Laufrichtung, wobei sich das für die erste Dimension mitgeteilte Fließmittelsystem ebenfalls bewährt hat. Bei dieser Verfahrensweise befinden sich alle Substanzen die der Derivatisierungsreaktion nicht zugänglich waren auf der Diagonalen des Hauptfeldes (kleinere Abweichungen von dieser Regel kommen dadurch zustande, dass sich die Aktivität des Sorbens durch die Manipulationen zwischen den beiden Trennschritten etwas verändern kann). Die reaktionschromatographische Trennung ist nun vollzogen und die Platte wird unter dem Abzug getrocknet.

Methodik des Nachweises. Zum Nachweis der einzelnen Derivate wird das Chromatogramm in eine Kammer gebracht, die nitrose Gase (darunter N_2O_3) enthält (Becherglas mit ca. 20%iger wässriger Natriumnitritlösung in der Kammer; durch eine Öffnung im Deckel der Kammer mit einer Pipette 5–10 ml 25%ige Salzsäure zufließen lassen).

Hierbei erfolgt während einer Verweildauer von 3–5 min die Diazotierung der primären aromatischen Aminogruppen. Nach dem Herausnehmen der DC-Platte lässt man die anhaftenden nitrosen Gase unter dem Abzug völlig abdampfen (etwa 30–45 min; Geruchsprobe). Beim Kuppeln an Bratton-Marshall-Reagens³² (Besprühen mit einer Lösung von 1 g N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin in 50 ml Dimethylformamid und 50 ml 4 N Salzsäure) bilden sich purpurrote und violette Farbtönungen aus (Erfassungsgrenze bis zu etwa 0,02 μ g pro Fleck).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fig. 6 und 7 mit den ausführlichen Abbildungslegenden veranschaulichen

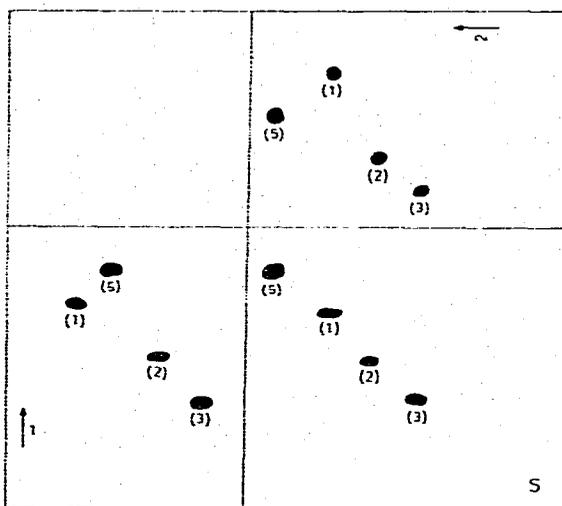


Fig. 6. Zweidimensionale DC Trennung der Substanzen (1), (2), (3) und (5) ohne Derivatisierungsreaktion. Fließmittel für beide Laufrichtungen: Benzol-Isopropanol-Ammoniak (25%). (80:20:1); aufsteigende Methode; Kammersättigung.

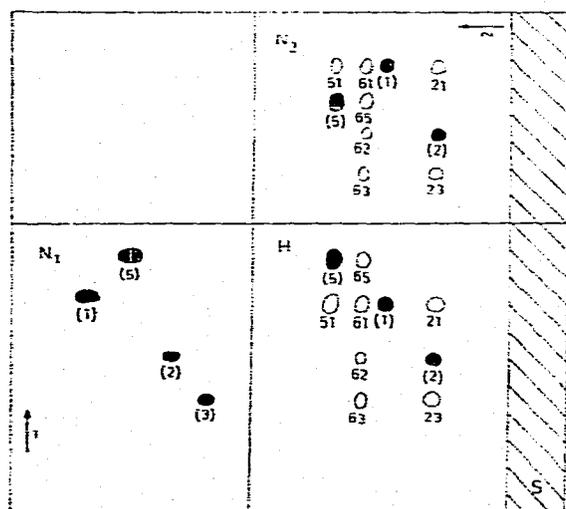


Fig. 7. Zweidimensionale reaktionschromatographische Trennung der Substanzen (1), (2), (3) und (5). Derivatisierung durch Besprühen des schraffiert gekennzeichneten Sektors mit Titan(III)-chlorid-Lösung, sonst wie Abb. 6. ● = undervisierte Substanzen; ○ = Derivate. Bei den zweistelligen Ziffern kennzeichnet die erste Zahl das entstandene Derivat; die zweite Ziffer gibt an, aus welcher Substanz das entsprechende Produkt reaktionschromatographisch entstanden ist. Beispiel: 51 bedeutet 2-Amino-5-nitrobenzophenon (5), das sich aus Nitrazepam (1) durch Hydrolyse gebildet hat. S = Startpunkt; H = Hauptfeld; N₁ und N₂ = Vergleichsfelder.

unsere Ergebnisse. Es dürfte deutlich zu erkennen sein, dass es mit Hilfe der reaktionschromatographischen Methodik möglich wird, den Aussagewert von Dünnschichtchromatogrammen unter vertretbarem zusätzlichem Arbeitsaufwand wesentlich zu steigern. Die hier mitgeteilte Arbeitsweise sollte nicht nur als Beitrag zur Analytik der Benzodiazepine verstanden werden; wir hoffen darüber hinaus, dass sie auf dieses relativ neue Gebiet dünnschichtchromatographischer Anwendungsbereiche aufmerksam macht und Anregungen vermittelt, die zu einem Einsatz der Reaktionschromatographie auch bei anderen Problemstellungen führen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Analysenmethode zum Nachweis von Nitrazepam und seiner Metaboliten mitgeteilt. Nach der Trennung in der ersten Laufrichtung zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie werden die Substanzen mit Hilfe von TiCl₃, das in wässriger saurer Lösung Anwendung findet, derivatisiert. Durch eine kombinierte Hydrolyse und Reduktion werden Nitrazepam und seine Metaboliten auf der Platte reproduzierbar in Derivate überführt, die sich nach einem ebenfalls mitgeteilten Schema bilden. Die anschließende Trennung in der zweiten Dimension gestattet eine genaue Zuordnung mit Hilfe der R_F-Werte und der Reaktion nach Bratton-Marshall. Die Nachweisgrenze beträgt 0.02 µg. Der Beitrag soll die Möglichkeiten der Reaktionschromatographie aufzeigen und zu weiteren Anwendungen anregen.

LITERATUR

- 1 M. Wilk, U. Hoppe, W. Taupp und J. Rochlitz, *J. Chromatogr.*, 27 (1967) 311.
- 2 M. Wilk und U. Brill, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 301 (1968) 282.
- 3 M. Wilk und W. Taupp, *Z. Naturforsch. B*, 24 (1969) 16.
- 4 H. Schütz, unveröffentlicht.
- 5 C. Schütz und H. Schütz, *Arch. Toxikol.*, 28 (1972) 286.
- 6 C. Schütz und H. Schütz, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 113 (1973) 1559.
- 7 C. Schütz und H. Schütz, *Arzneim.-Forsch.*, 23 (1973) 428.
- 8 C. Schütz und H. Schütz, *Z. Klin. Chem. Biochem.*, 10 (1972) 528.
- 9 C. Schütz, E. Muskat, D. Post, G. Schewe und H. Schütz, *Z. Anal. Chem.*, 262 (1972) 282.
- 10 C. Schütz und H. Schütz, *Arch. Toxikol.*, 30 (1973) 183.
- 11 C. Schütz, H. Schütz und Y. D. Ha, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 113 (1973) 1967.
- 12 H. Schütz, *Chromatographia*, im Druck (1974).
- 13 H. Schütz, *Pharmazie*, im Druck (1974).
- 14 H. Schütz und A. Schindler, *Z. Anal. Chem.*, im Druck (1974).
- 15 J. Kofoed, C. Korczak-Fabierkiewicz und G. H. W. Lucas, *Nature (London)*, 204 (1964) 750.
- 16 R. A. de Zeeuw und J. Wijsbeek, *J. Chromatogr.*, 48 (1970) 222.
- 17 F. Schmidt, *Krankenhaus-Apoth.*, 23 (1973) 10.
- 18 J. Rieder, *Arzneim.-Forsch.*, 15 (1964) 1134.
- 19 O. Pribilla, *Arzneim.-Forsch.*, 15 (1965) 1148.
- 20 K.-H. Beyer und W. Sadée, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 1929.
- 21 K.-H. Beyer, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 111 (1971) 1503.
- 22 H. Oelschläger, J. Volke, G. T. Lim und U. Frank, *Arzneim.-Forsch.*, 16 (1966) 82.
- 23 S. L. Tompset, *J. Clin. Pathol.*, 21 (1968) 366.
- 24 K.-H. Beyer und W. Sadée, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 302 (1969) 152.
- 25 H. Sawada und K. Shinohara, *Arch. Toxikol.*, 27 (1970) 71.
- 26 H. Sawada und K. Shinohara, *Arch. Toxikol.*, 28 (1971) 214.
- 27 J. Rieder, *Arzneim.-Forsch.*, 23 (1973) 207.
- 28 J. Rieder, *Arzneim.-Forsch.*, 23 (1973) 212.
- 29 M. Geldmacher-von Mallinckrodt, persönliche Mitteilung (1973).
- 30 L. H. Sternbach, *Angew. Chem.*, 83 (1971) 70.
- 31 L. H. Sternbach, R. I. Fryer, O. Keller, W. Metlesics, G. Sach und N. Steiger, *J. Med. Pharm. Chem.*, 6 (1963) 261.
- 32 A. C. Bratton und E. K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 537.