

CHROM. 11,338

## MIKROPRÄPARATION WICHTIGER FLUNITRAZEPAM-METABOLITEN DURCH REAKTIONEN AUF DER DÜNNSCHICHTPLATTE

H. SCHÜTZ

*Institut für Rechtsmedizin im Zentrum für Ökologie des Fachbereichs Humanmedizin der Justus Liebig-Universität, Frankfurter Strasse 58, D-6300 Giessen (B.R.D.)*

(Eingegangen am 11. April 1978; geänderte Fassung eingegangen am 18. Juli 1978)

### SUMMARY

*Micro-preparation of some important flunitrazepam metabolites by reaction on thin-layer plates*

A micro-method is described for the synthesis of 7-aminoflunitrazepam, 7-acetamidoflunitrazepam and N-1-desalkylflunitrazepam on the sorbent of thin-layer chromatograms. By means of the method reported, also many other important benzodiazepine derivatives may be prepared.

### EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Mikropräparation von drei wichtigen Flunitrazepam-Metaboliten auf der Sorbenschicht der dünn-schichtchromatographischen (DC) Platte beschrieben. Die aufgezeigte Technik eignet sich jedoch in analoger Weise auch zur Synthese von 7-Aminonitrazepam, 7-Acetamidonitrazepam, 7-Aminoclonazepam, 7-Acetamidoclonazepam sowie zur Desalkylierung der N-alkylierten Benzodiazepine Diazepam, Flurazepam und Prazepam.

Im Rahmen dieser Mitteilung soll der Schwerpunkt auf der präparativen Seite liegen. Bezüglich qualitativer Aspekte der Methode siehe Lit. 1. Weiterhin wurden analytische Daten der Metaboliten von Clonazepam und Nitrazepam<sup>2</sup> bzw. Flunitrazepam<sup>3</sup> von uns bereits publiziert.

### EXPERIMENTELLES

*Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam und 7-Acetamidoflunitrazepam*

*Zur Biotransformation von Flunitrazepam.* Nach vorangegangenen Untersuchungen<sup>3,4</sup> ist für die Biotransformation von Flunitrazepam das in Fig. 1 wiedergegebene Schema gültig, das in vielen Einzelheiten Analogien zum Stoffwechsel von Clonazepam bzw. Nitrazepam aufweist<sup>5,6</sup>.

Wichtige Metabolisierungsschritte sind wiederum (1) Desalkylierung in N-1-Stellung; (2) Reduktion der 7-Nitrogruppe mit anschließender Acetylierung; (3) Hydroxylierung in 3-Stellung (incl. Konjugatbildung).

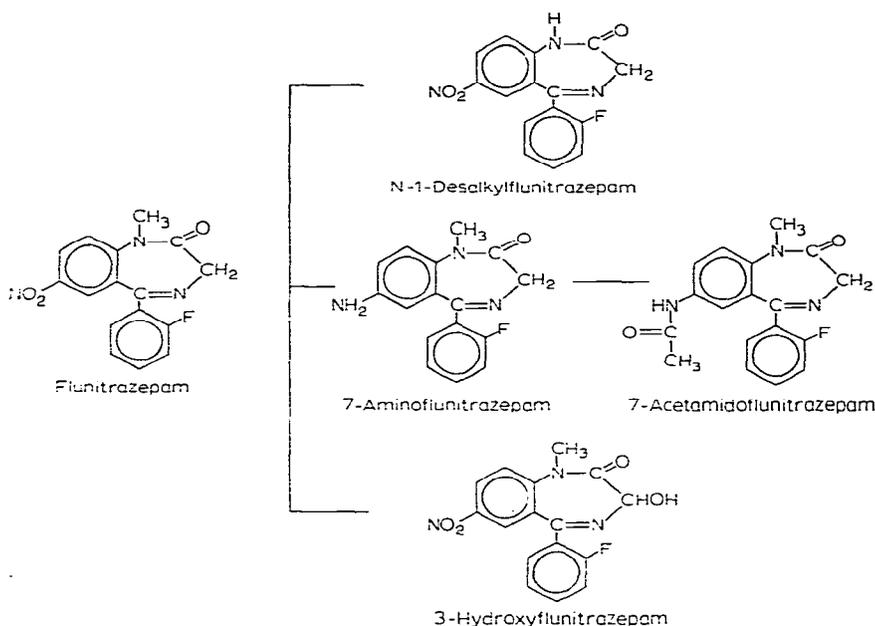


Fig. 1. Biotransformation von Flunitrazepam (Rohypnol).

Flunitrazepam wird, wie alle anderen in 7-Position nitro-substituierten Benzodiazepine, praktisch quantitativ metabolisiert, das heisst renal werden allenfalls Spuren des unveränderten Pharmakons ausgeschieden. Bei der Aufarbeitung biologischen Materials ist somit nahezu ausschliesslich mit der Gewinnung von Stoffwechselprodukten zu rechnen. Die analytische Erfassung dieser Derivate steht daher im Rahmen der chemisch-toxikologischen Analyse im Vordergrund.

3-Hydroxyflunitrazepam kann ebenfalls auf der DC-Platte dargestellt werden. Im Hinblick auf die geringe Bedeutung dieses Metaboliten im Rahmen der Analytik wurde auf die Wiedergabe der ausführlichen Präparationsvorschrift verzichtet. Zur Darstellung von 3-Hydroxydiazepam bzw. 3-Hydroxyprazepam, von denen insbesondere das zuletzt genannte Derivat eine wesentlich wichtigere Rolle als Biotransformationsprodukt spielt, vgl. Lit. 8.

*Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam auf der DC-Platte.* Auf der Startlinie einer üblichen DC-Fertigplatte Kieselgel 60F<sub>254</sub> (20 × 20 cm; z.B. Art. Nr. 5715; Merck, Darmstadt, B.R.D.), ohne besondere Aktivierung, werden 1–2 mg Flunitrazepam durch Auftragen einer verdünnten Lösung (in 1 ml Essigsäureäthylester) mit Hilfe eines Chromatochargers oder ähnlichen Gerätes aufgebracht. Nach dem Verflüchtigen des Lösungsmittels wird die DC-Platte mit Hilfe von Streifen so abgedeckt, dass lediglich die Auftragezone frei liegt. Anschliessend erfolgt das Aufsprühen des Reagenzes [Titan(III)-chloridlösung, 15%ige wässrige Lösung; Art. Nr. 808307; Merck]. Die Lösung soll die Sorbensschicht voll durchdringen, durch Betrachten der Platte von der Rückseite kann bequem kontrolliert werden, ob dieser für einen möglichst quantitativen Umsatz erforderliche Zustand erreicht ist.

Die DC-Platte wird nun mit warmer (keineswegs heisser) Luft so lange getrocknet, bis die graublau Färbung des Titan(III)-chloridsprays verschwindet. Bei

höheren Temperaturen muss mit einer Hydrolyse zu Aminobenzophenonen gerechnet werden, da die wässrige Titan(III)-chloridlösung infolge Hydrolyse stark sauer reagiert. Aus diesem Grund liegen die bei der Reduktion entstandenen Amine als Hydrochloride vor und müssen vor der nachfolgenden dünn-schichtchromatographischen Trennung bzw. Reinigung in die entsprechenden Basen überführt werden, da nur in dieser Form ein befriedigendes chromatographisches Trennverhalten gegeben ist. Dies geschieht durch etwa 5 minütiges Einstellen der Platte in eine geschlossene Glaskammer (leerer Chromatographiertank), die Ammoniakdämpfe enthält (Becherglas mit etwa 25% Ammoniak auf dem Boden der Kammer).

Zur Entwicklung der Platte eignet sich insbesondere das Fließmittel Essigsäureäthylester-Methanol-konz. Ammoniak (85:10:5, v/v/v), da sich mit diesem Gemisch einerseits aussergewöhnlich scharfe Substanzzonen auch bei höheren  $R_F$ -Werten bilden und andererseits evtl. noch vorhandene Hydrochloridreste durch den Ammoniakanteil quantitativ in die entsprechenden Basen überführt werden. 7-Aminoflunitrazepam kann im  $R_F$ -Wert-Bereich 0.85 mit Hilfe der Fluoreszenzlöschung indiziert werden. Anschliessend schabt man die entsprechende Zone des Chromatogrammes aus und saugt den mit 7-Aminoflunitrazepam versetzten Kieselgelanteil in einer Mikrofritte wiederholt mit Essigsäureäthylester ab. Nach dem Einengen des Extraktes im Vakuumrotationsverdampfer sollte die Substanz möglichst rasch chromatographisch bzw. spektroskopisch untersucht werden, da sie als primäres Amin leicht den gewohnten Umwandlungen und Zersetzungen unterliegt.

Beim Einsatz von Diäthyläther als Elutionsmittel ist unbedingt zu berücksichtigen, dass auch die handelsüblichen p.a.-Reinheitsgrade vielfach mit Jonol [typische  $m/e$  Werte: 205 =  $M^+$  - 15; 57 =  $(CH_3)_3C^+$ ] zur Stabilisierung versetzt sind.

*Darstellung von 7-Acetamidoflunitrazepam auf der DC-Platte.* 7-Acetamidoflunitrazepam bildet sich auf der DC-Platte mit nahezu 100%iger Ausbeute, wenn man das Chromatogramm, auf dessen Startlinie sich 7-Aminoflunitrazepam befindet (Darstellung siehe unter *Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam auf der DC-Platte*), nach Freisetzen der Base aus eventuellen Salzverbindungen mit dem Fließmittel Essigsäureäthylester-Essigsäureanhydrid (95:5, v/v) entwickelt. Die Elution ( $R_F$ -Wert-Bereich 0.20-0.30) erfolgt in der oben näher beschriebenen Weise. Insbesondere vor dem Messen der Spektren muss die Acetamidoverbindung gründlich von allen Lösungsmittelresten (Schwerflüchtigkeit von Essigsäureanhydrid) befreit werden.

#### *Darstellung von N-1-Desalkylflunitrazepam (Nor-Flunitrazepam)*

*Allgemeine Ausführungen.* Während Desalkylierungsreaktionen *in vivo* eine grosse Rolle spielen, da Fremdstoffe (z.B. Pharmaka) auf diese Weise polarer und damit renal leichter exkretierbar werden, existieren so gut wie keine einfache und mit höherer Ausbeute durchführbaren präparativen Methoden zur Abspaltung von N-Alkylgruppen. Alkylierungsverfahren (z.B. mit Dialkylsulfat oder Diazomethan) sind dagegen vielfältig bekannt und in Anwendung.

Bereits im Rahmen qualitativer Untersuchungen<sup>1</sup> konnte nachgewiesen werden, dass Desalkylierungsreaktionen auf photochemischem Weg möglich sind. Durch eine Optimierung des Verfahrens (vgl. nachstehende Ausführungen) gelang es auch, photolytische Desalkylierungsreaktionen in befriedigender Ausbeute für präparative Zwecke im Milligramm-Massstab einzusetzen. Es muss allerdings ausdrücklich dar-

auf hingewiesen werden, dass die Ausbeuten (nahezu 100%), der unter *Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam und 7-Acetamidoflunitrazepam* beschriebenen Reaktionen bei der präparativen Gewinnung der Nor-Verbindungen nicht erreicht wurden. Nach umfangreicher Ausarbeitung der nachstehend beschriebenen Technik lagen die Reaktionsausbeuten bei ca. 50%. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich, wie dargelegt, Nor-Verbindungen mittels konventioneller chemischer Methoden sonst nur durch eine komplette Synthese mit entsprechenden desalkylierten Ausgangsverbindungen erhalten lassen, erschien jedoch auch die Erarbeitung einer Methode mit geringeren Ausbeuten interessant und vertretbar.

*Versuche zur photolytischen Desalkylierung als Lösungsreaktion.* Bestrahlungsversuche in Quarzküvetten ergaben trotz Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel und Konzentrationen keine Hinweise auf das Entstehen erwähnenswerter Mengen an Nor-Verbindungen, obwohl sich insbesondere bei langen Belichtungszeiten ausserordentlich viele andere Substanzen bildeten. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte darin gesehen werden, dass es sich bei der photolytischen N-Desalkylierung offensichtlich um eine Reaktion handelt, die bereits durch Hydratation bzw. Solvation unterbunden wird. Für diese Modellvorstellung sprechen auch folgende Beobachtungen bei der qualitativen Erprobung der Methode: Offensichtlich fand die Desalkylierung nur bei denjenigen Molekülen statt, die sich unmittelbar auf der Sorbensoberfläche befanden. Wurde eine DC-Platte nämlich nach Bestrahlung mit UV-Licht nochmals mit einem geeigneten Fließmittel entwickelt, so traten aus tieferen Schichten des Sorbens offensichtlich noch nicht desalkylierte Substanzanteile an die Oberfläche, die bei einer nachfolgenden Bestrahlung wiederum primäre aromatische Amine (Nachweis mit Hilfe der Reaktion nach Bratton und Marshall<sup>7</sup>) lieferten.

Eine Optimierung der Methode musste demnach das Ziel verfolgen, mit Hilfe einer geeigneten Technik möglichst hohe Substanzanteile an die Oberfläche der DC-Platte zu bringen.

*Photolytische Desalkylierung von Flunitrazepam unter präparativen Aspekten auf der DC-Platte.* In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl aufgesprühte als auch mit dem Chromatocharger aufgetragene Substanzlösungen tief in die Sorbensschicht eindringen und so der Einwirkung der UV-Strahlung entzogen wurden. Mit Hilfe der nachstehend beschriebenen Technik gelang es, die zu desalkylierende Substanz im wesentlichen auf der Plattenoberfläche zu konzentrieren: Hierzu legt man eine präparative Dünnschichtplatte (z.B. Art. Nr. 5717; Merck) in Aceton oder Essigsäureäthylester, bis sie ein Maximum an Lösungsmittel aufgesaugt hat. Unmittelbar danach wird die noch tropfnasse Platte mit der Lösung des zu desalkylierenden Benzodiazepins besprüht. Hierbei dringen allenfalls unwesentliche Substanzmengen in das Sorbensinnere, da dieses bereits mit Lösungsmitteln abgesättigt ist. Beim anschliessenden Ablüften der Platte mit Warmluft treten die im unteren Teil der Trägerschicht enthaltenen Lösungsmittelanteile wieder an die Oberfläche wobei Substanzreste, die vorher geringfügig in die Schicht diffundierten, wiederum an die Plattenoberfläche gelangen. Auf diese Weise wird erreicht, dass wesentlich höhere Anteile der Probesubstanz bei der UV-Bestrahlung exponiert sind.

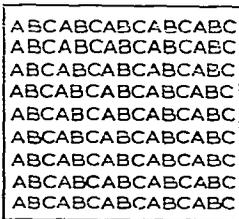
Eine Belichtung der Platte darf erst nach dem Verflüchtigen aller Lösungsmittelreste erfolgen. Auch bei den präparativen Untersuchungen konnte bei Belichtungszeiten über 30 min keine Steigerung der Ausbeute mehr festgestellt werden. Die Anzahl der Nebenprodukte nahm bei längeren Exponierungen beträchtlich zu.

Der Abstand zwischen Strahlungsquelle und DC-Platte betrug etwa 40 cm. Die Platte wurde unter dem Abzug (Ozonbildung) mit Hilfe einer Stativklammer fixiert. Als Strahler wurden sowohl kommerzielle Geräte für Photoreaktionen (z.B. TQ 150; Hanau) als auch eine Höhensonne (allerdings ohne zusätzliche zwangsweise IR-Strahlung, wie sie neuerdings zur Vermeidung von UV-Überdosierungen vorgeschrieben ist) eingesetzt.

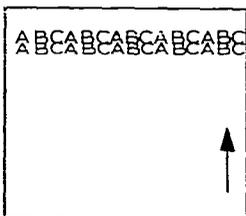
Nach der Bestrahlung befinden sich auf der Plattenoberfläche zahlreiche Substanzen gleichmässig verteilt (z.B. unumgesetztes Flunitrazepam, Nor-Flunitrazepam, zahlreiche Nebenprodukte). Beim Entwickeln der Platte mit einem äusserst polaren Fließmittel (z.B. Aceton) gelingt es, diese Reaktionsprodukte auf einem Streifen am oberen Ende der Platte (bei aufsteigender Technik) zu konzentrieren, da alle Derivate bei Verwendung von Aceton als Fließmittel praktisch bis zum  $R_F$ -Wert-Bereich 1.0 wandern.

Zur Trennung der verschiedenen Substanzen wird die Platte nach gründlichem Ablüften um  $180^\circ$  gedreht und mit dem Fließmittelgemisch Benzol-Isopropanol-konz. Ammoniak (80:20:1, v/v/v) entwickelt.

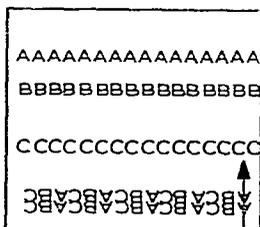
Die geschilderte Methodik ist in der nachstehenden schematischen Darstellung nochmals zusammenfassend wiedergegeben: (a) Nach der Bestrahlung liegen die Substanzen A, B und C verteilt auf der gesamten Plattenfläche vor:



(b) Nach dem Entwickeln mit Aceton wurden alle Substanzen in einem Band am oberen Rand der Platte konzentriert:



(c) Durch Drehen der Platte um  $180^\circ$  und Entwickeln mit Benzol-Isopropanol-konz. Ammoniak werden die einzelnen Komponenten getrennt.



Die einzelnen Derivate können anhand der Fluoreszenzlöschung bei folgenden  $R_F$ -Werten indiziert werden:

$R_F$ -Wert	Substanz
0.85	Flunitrazepam
0.72	Nor-Flunitrazepam
0.62 und 0.57	Nicht näher identifizierte Nebenprodukte

Die Elution erfolgt zweckmässigerweise mit Essigsäureäthylester (vgl. Ausführungen hierzu unter *Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam auf der DC-Platte*).

## ERGEBNISSE

7-Aminoflunitrazepam und 7-Acetamidoflunitrazepam lassen sich in nahezu quantitativer Ausbeute mit Hilfe von Reaktionen auf der DC-Platte darstellen. Hierbei entfallen zeitraubende Zwischenextraktionen und Reinigungsschritte. Ausserdem tritt bei der Synthese auf der Platte die sonst im sauren Reaktionsmedium stark ausgeprägte Hydrolyse zu den Aminobenzophenonderivaten in den Hintergrund. Dies dürfte nicht zuletzt auch darauf zurückzuführen sein, dass sich der Reaktionsablauf auf der Platte praktisch bei Zimmertemperatur abspielt, was wiederum als Indiz für die erhöhte Reaktionsfähigkeit vieler Substanzen im absorbierten Zustand auf der Platte anzusehen sein dürfte.

Aufgrund der Untersuchungen kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass photolytische Desalkylierungsreaktionen in Lösungen nicht ohne weiteres durchführbar sind. Auf der DC-Platte konnten hingegen nach Entwicklung einer speziellen Arbeitstechnik Umsetzungen mit befriedigenden Ausbeuten erzielt werden.

## DANK

Wir danken der Fa. Hoffmann-La Roche für die ständige Unterstützung unserer Arbeiten.

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird eine Mikromethode zur Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam, 7-Acetamidoflunitrazepam und N-1-Desalkylflunitrazepam mit Hilfe von Synthesen auf der Sorbensschicht von DC-Platten beschrieben. Die Methode eignet sich auch zur Präparation zahlreicher weiterer wichtiger Benzodiazepinderivate.

## LITERATUR

- 1 S. Ebel, B.-M. Langer und H. Schütz, *Mikrochim. Acta (Wien), Suppl. II*, (1977) 261.
- 2 S. Ebel und H. Schütz, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 325.
- 3 S. Ebel und H. Schütz, *Z. Rechtsmed.*, 81 (1978) 107.
- 4 J. P. Cano, J. Guintrand, C. Aubert und A. Viala, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 338.
- 5 E. Eschenhof, *Arzneim.-Forsch.*, 23 (1973) 390.
- 6 J. Rieder, *Arzneim.-Forsch.*, 15 (1965) 1134.
- 7 A. C. Bratton und E. K. Marshall, Jr., *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 537.
- 8 S. Ebel und H. Schütz, *Arzneim.-Forsch.*, im Druck.