

CHROM. 13,034

## Note

### **N-Chlormethyl-4-nitro-phthalimid als Derivatisierungsreagens für die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie**

WOLFGANG LINDNER

*Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität in Graz, A 8010 Graz (Österreich)*

(Eingegangen am 22. April 1980; geänderte Fassung eingegangen am 13. Juni 1980)

Die, heute in der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) üblich verwendeten, UV-Detektoren sind für Verbindungen mit schwachen Chromophoren nur ungenügend empfindlich. Diesem Umstand kann meist durch Derivatisierung etwaiger funktioneller Gruppen mit stark UV- bzw. fluoreszenzaktiven Reagenzien begegnet werden; eine Zusammenstellung der wichtigsten Reaktionstypen wird in den Übersichtswerken von Lawrence und Frei<sup>1</sup>, sowie Blau und King<sup>2</sup> gegeben. Kürzlich stellten Lindner und Santi<sup>3</sup> eine neue Reagenziengruppe für die Derivatisierung von Karbonsäuren, Phenolen und Barbituraten (OH- und -NH acide Verbindungen), die N-Chlormethyl-phthalimide, vor. Weitere Untersuchungsergebnisse über N-Chlormethyl-4-nitro-phthalimid (CIMNPI), als stark UV-aktives Derivatisierungsreagens für Barbiturate und Karbonsäuren werden nun in vorliegender Arbeit beschrieben.

Ein, dem CIMNPI in seiner Reaktivität, ähnliches Derivatisierungsreagens stellt das 1-Chlormethylisatin (CMI) dar<sup>4-6</sup>, welches hinsichtlich seiner Anwendbarkeit für die HPLC von Gübitz<sup>7</sup> untersucht wurde.

#### EXPERIMENTELLES

##### *HPLC-System*

Sämtliche Analysen wurden auf einem HPLC-System folgender Komponenten durchgeführt: Pumpe 110 A (Altex); UV-Detektor 1036 A (Hewlett-Packard); Integrator 3380 (Hewlett-Packard); Injektionssystem 7120 (Rheodyne). Als Trennsystem dienten Säulen (200 × 4.6 mm I.D.), gefüllt mit LiChrosorb RP-8 (7 µm; Merck, Darmstadt, B.R.D.).

##### *Reagenzien*

Die Lösungsmittel (Merck) hatten analytischen Reinheitsgrad und kamen ohne weitere Reinigung zur Anwendung. CIMNPI wurde analog der Methode von Böhme und Schwartz<sup>12</sup> synthetisiert. Das CIMNPI, sowie dessen Lösungen in trockenem Acetonitril sind bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss über mehrere Monate unzersetzt haltbar. Die Barbiturate hatten den für pharmazeutische Zwecke zugelassenen Reinheitsgrad.

### Derivatisierungsreaktionen

**Methode A.** Ein bis 100  $\mu\text{M}$  Karbonsäuren bzw. Barbiturate werden in konische 1-ml Gefäße mit mindest 10-fachem molarem Überschuss CIMNPI und 3-fach molarem Überschuss TEA in 100  $\mu\text{l}$  Acetonitril versetzt, verschlossen und 3 h bei 60°C gehalten. Nach Abkühlung und Zentrifugation können die Reaktionslösungen direkt auf die Säule injiziert werden.

**Methode B.** Wie Methode A, nur mit dem Unterschied, dass die Base TEA durch ca. 20-fachen Überschuss an fein gepulvertem  $\text{KHCO}_3$ , sowie 3-fach molarem Überschuss an Kronenäther (18-crown-6 der Firma Fluka, Buchs, Schweiz) ersetzt wird.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Schema der CIMNPI Reaktion mit Barbituraten ist in Fig. 1 dargestellt. Die Struktur der Umsetzungsprodukte wurde durch Kernresonanz- und Massenspektroskopie gesichert, wobei besonders erwähnenswert ist, dass im Falle von  $\text{R}_3 = \text{H}$  (z.B. Butalbital) beide NH-Gruppen derivatisiert werden und ein di-N-Methyl-4-nitro-phthalimid (-MNPI) Kondensationsprodukt des Barbiturates entsteht. In Barbituraten sind die  $\text{pK}_a$  Werte der beiden NH-Gruppen unterschiedlich ( $\text{pK}_{a(1)} = \text{ca. } 7.3$  bis  $8.0$  und  $\text{pK}_{a(2)} = \text{ca. } 12.5$ ) (Lit. 8); die zweite Dissoziationsstufe entspricht einer sehr schwachen Säure, deren Acidität aber trotzdem ausreicht um obige Reaktion einzugehen.

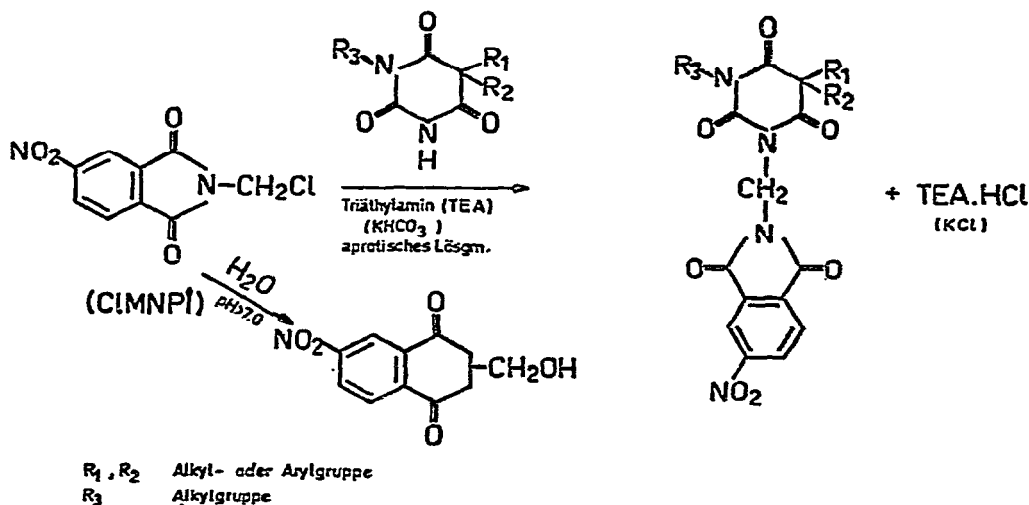


Fig. 1. Schema der CIMNPI-Reaktion mit Barbituraten.

Den reaktionskinetischen Verlauf der Butalbital-Derivatisierung gibt Fig. 2 graphisch wieder, wobei das Zwischenprodukt, das monosubstituierte MNPI-Butalbital, chromatographisch ebenfalls erfasst werden konnte (Fig. 3).

Die Interpretation der experimentellen Reaktionskurven der Hexobarbital-CIMNPI Reaktion (Fig. 4), wo nur eine freie NH-Gruppe zur Derivatisierung zur

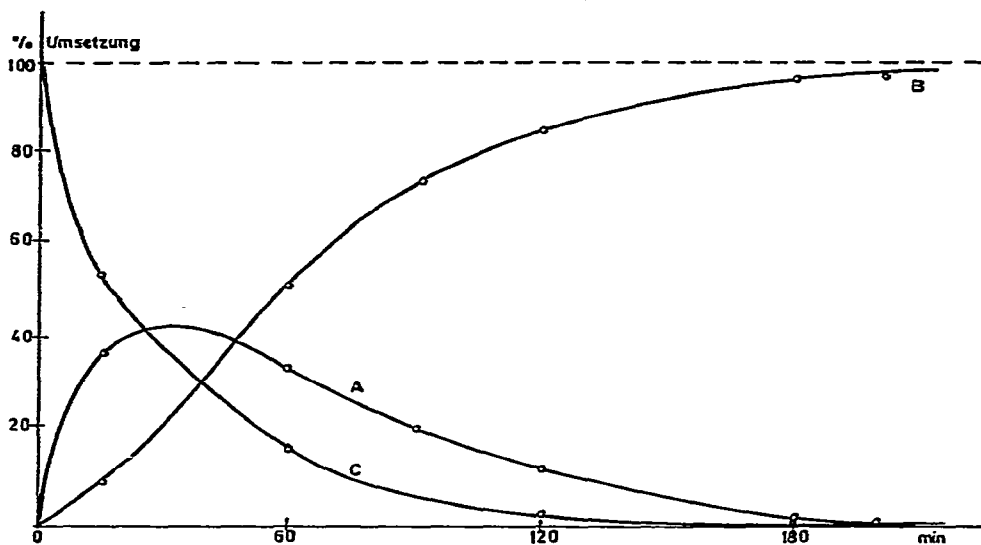


Fig. 2. Reaktionsumsatz von Butalbital mit CIMNPI in Acetonitril bei 60°C. Reaktionsbedingungen: 2 mM Butalbital + 6 mM TEA + 28 mM CIMNPI/ml Acetonitril. A = mono-MNPI-Butalbital; B = di-MNPI-Butalbital; C = Butalbital.

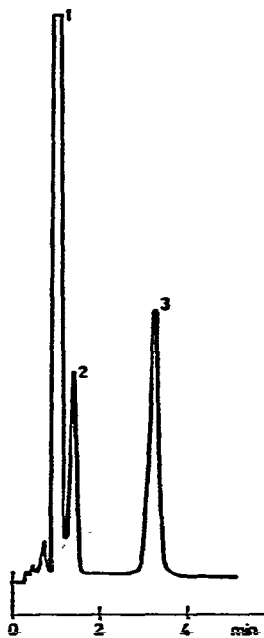


Fig. 3. Trennung von mono- und di-MNPI-substituiertem Butalbital. Säule 200 × 4.6 mm I.D., gepackt mit RP-8, 7 μm; mobile Phase Wasser-Acetonitril (55:45), Durchflussgeschwindigkeit 1 ml/min; UV bei 254 nm. Peakbezeichnung: 1 = CIMNPI; 2 = mono-MNPI-Butalbital; 3 = di-MNPI-Butalbital.

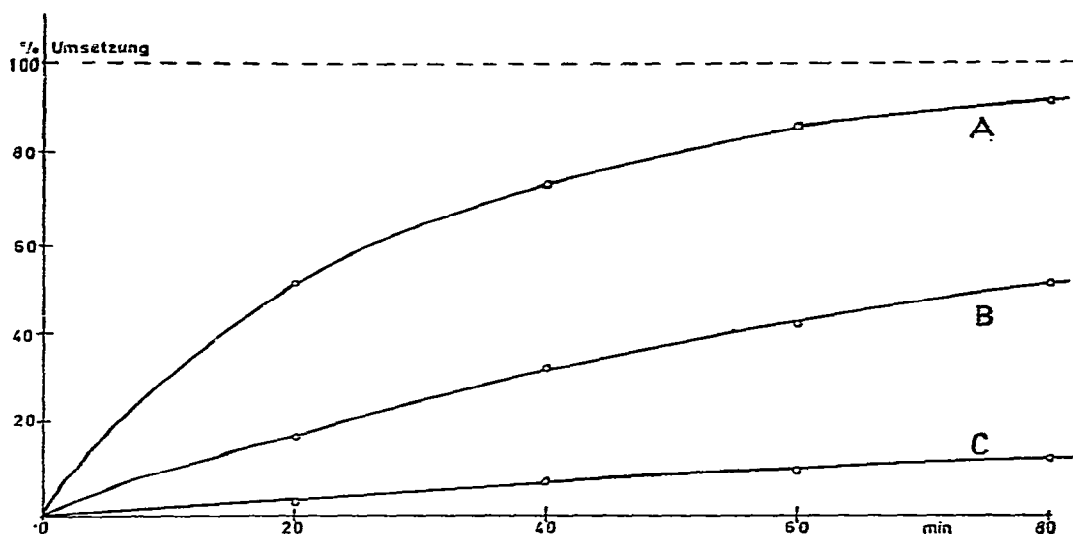


Fig. 4. Reaktionsumsatz von Hexobarbital mit CIMNPI in Acetonitril bei 60°C. Reaktionsbedingungen: A = wie Fig. 2; B = 2 mM Hexobarbital + 6 mM TEA + 4 mM CIMNPI/ml Acetonitril; C = zehnfache Verdünnung von B.

Verfügung steht, zeigt, dass diese Reaktion nach dem Gesetz zweiter Ordnung, wobei sie jeweils erster Ordnung in Bezug auf die beiden Reaktionspartner A (Barbiturat) und B (CIMNPI) ist, verläuft. Dies ergibt sich aus der graphischen Darstellung des  $\log([B]/[A])$  als Funktion der Reaktionszeit, wofür man annähernd eine Gerade erhält; es gilt somit die Beziehung<sup>9</sup>

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A][B]$$

Vermutlich ist auch die Folgereaktion im Falle einer Zweifachderivatisierung, wie z.B. beim Butalbitol, zweiter Ordnung, doch reichen die experimentellen Daten für eine derartige Festlegung nicht aus.

Karbonsäuren reagieren ebenfalls nach dem Gesetz zweiter Ordnung. Sofern keine sterischen Hinderungen die CIMNPI-Alkylierungsreaktion saurer Protonen beeinflussen, darf man annehmen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkendem  $pK_a$  Wert der aciden Gruppen steigt.

*Faktoren, welche die Reaktionsgeschwindigkeit der CIMNPI-Umsetzung mit Barbituraten und Karbonsäuren (NH- und OH-acide Verbindungen) beeinflussen*

(a) Wie in Fig. 1 dargestellt, läuft die Reaktion nur dann ab, wenn dem sehr aktiven Chlor im CIMNPI ein Salz einer aciden Verbindung angeboten wird. Demzufolge können die K-(Na)-Salze der Säuren direkt eingesetzt oder intermediär durch Zugabe von überschüssigem, festen, feingekörnten  $KHCO_3$  zum Reaktionsmedium dargestellt werden. In beiden Fällen verwendet man vorteilhaft Kronenäther als Phasentransferkatalysator, um die CIMNPI Reaktion rasch ablaufen zu lassen. Durst *et al.*<sup>10</sup> setzten erstmals mit Erfolg Kronenäther als Katalysator für derartige Alkylierungsreaktionen ein.

Auch intermediär gebildete Ammoniumsalze der sauren Verbindungen (Triäthylammonium-Salze), welche durch Zugabe von überschüssigem Amin zur Säurekomponente entstehen, gehen in quantitativer Ausbeute die CIMNPI-Reaktion ein. Die Umsetzung der Ammoniumsalze verläuft allerdings langsamer als die der, durch Kronenäther katalysierten, Kaliumsalze<sup>7,10</sup>.

(b) Nachdem die CIMNPI Reaktion zweiter Ordnung ist, erzielt man Reaktionszeitverkürzungen durch Erhöhung des Reagenzüberschusses, welcher für die Barbituratderivatisierung minst zehnfach sein muss. Ebenso sollten die Reaktionspartner in möglichst hoher Konzentration im Reaktionsmedium vorliegen (Fig. 4).

(c) Selbstverständlich bringt auch eine Temperaturerhöhung Reaktionszeitverkürzung. Als praktikable Umsetzungstemperatur erweist sich 60°C (Trockenschrank).

(d) Die Art des Reaktionsmediums (aprotisches Lösungsmittel) bestimmt ebenfalls die Reaktionsgeschwindigkeit; sie nimmt in Richtung DMF > Acetonitril > Aceton ab. Kleinere Mengen von Wasser stören meist nicht, da die CIMNPI Umsetzung zum N-Hydroxymethyl-4-nitro-phthalimid (OHMNPI) nur langsam verläuft.

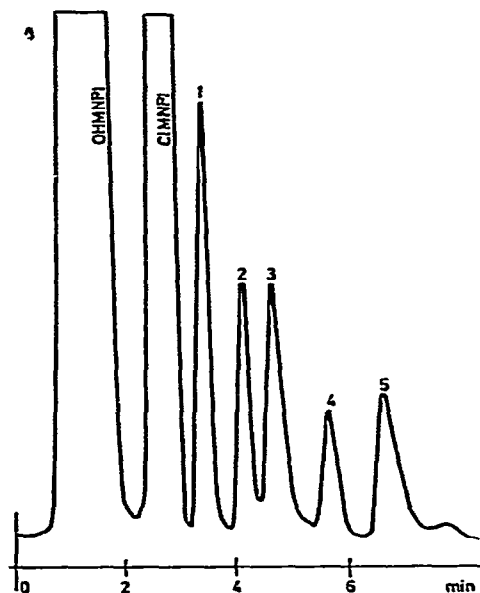
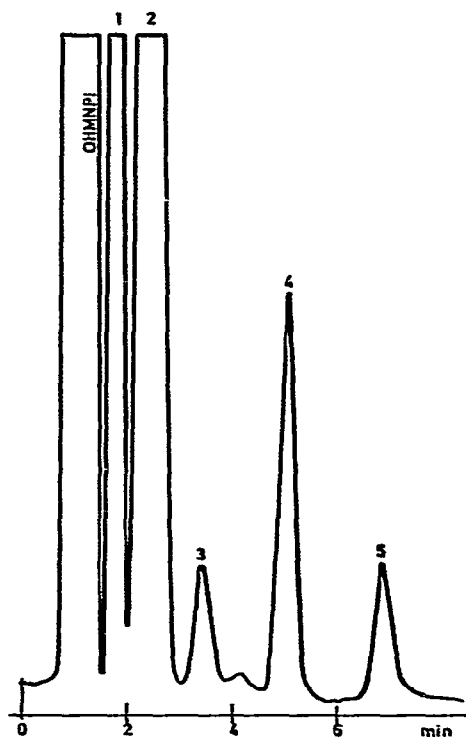


Fig. 5. Trennung von di-MNPI-substituierten Barbituraten. Säule wie Fig. 3; mobile Phase: Methanol-Wasser (11:9), Durchflussgeschwindigkeit 2 ml/min; UV bei 254 nm; Peakbezeichnung: 1 = Barbital; 2 = Phenobarbital; 3 = Aprobarbital; 4 = Butalbital; 5 = Cyclobarbital.

Fig. 6. Trennung von MNPI-derivatisierten Fettsäuren. Säule wie Fig. 3; mobile Phase: Acetonitril-Wasser (4:6), Durchflussgeschwindigkeit 2 ml/min; UV bei 254 nm; Peakbezeichnung: 1 = Essigsäure; 2 = Propionsäure; 3 = Buttersäure; 4 = Valeriansäure; 5 = 2-Äthylbuttersäure.

Abschliessend werden Anwendungsbeispiele obiger Reaktion gezeigt. Fig. 5 stellt die Trennung eines derivatisierten Barbituratgemisches dar, wobei die Substanzpeaks mit einer Absolut-Konzentration von ca. 30 ng pro Komponente vorliegen. Bei einem Signal zu Rausch-Verhältnis von 3:1 sind bei 254 nm etwa 3 ng derivatisiertes Phenobarbital, dem etwa 5 pmol freies Phenobarbital entsprechen, nachzuweisen und gilt in etwa für sämtliche Barbiturate. Auch für die niederen derivatisierten Fettsäuren erreicht man obige Nachweisempfindlichkeit; ihre Trennung wird in Fig. 6 demonstriert.

Zusammenfassend ersieht man, dass mit dem CIMNPI für stark und schwach saure Gruppen ein reaktionsfähiges Derivatisierungsreagenz mit hoher UV-Empfindlichkeit bei 254 nm zur Verfügung steht. Die chromatographischen Eigenschaften der Derivate gestatten den Einsatz einfacher Reversed-Phase Trennsysteme. Die CIMNPI Derivatisierung eignet sich auch gut für Barbiturat-Monitoring in Serum und Plasma, da die Nachweisempfindlichkeiten weit unterhalb der therapeutischen Blutspiegelkonzentrationen liegen.

#### DANK

Für die ausgezeichnete Mitwirkung an dieser Arbeit sei Herrn H. Ruckendorfer gedankt.

#### LITERATUR

- 1 J. F. Lawrence und R. W. Frei, *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1976.
- 2 K. Blau und G. S. King, *Handbook for Chromatography*, Heyden & Son, London, 1977.
- 3 W. Lindner und W. Santi, *J. Chromatogr.*, 176 (1979) 55.
- 4 F. Knotz, *Sci. Pharm.*, 38 (1970) 227.
- 5 W. Wendelin und F. Knotz, *Monatsh. Chem.*, 103 (1972) 1632.
- 6 G. Gübitz und W. Wendelin, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 1690.
- 7 G. Gübitz, *J. Chromatogr.*, 187 (1980) 208.
- 8 I. Gyenes, *Titration in nicht wässrigen Medien*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1970, S. 429.
- 9 K. Schwetlick, *Kinetische Methoden zur Untersuchung von Reaktionsmechanismen*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1971, S. 38.
- 10 H. D. Durst, M. Milano, E. Kikta, S. Connelly und E. Grushka, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1797.
- 11 W. Lindner und W. Truger, *J. Chromatogr.*, 168 (1979) 171.
- 12 H. Böhme und H. Schwartz, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 307 (1974) 775.