

Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany

3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid als Reagenz zur Charakterisierung von Arzneistoffen und zur Aktivierung polarographisch inaktiver Verbindungen

W. KÖHLER und H. OELSCHLÄGER

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Fleischhacker, Wien, zum 70. Geburtstag in Freundschaft gewidmet

3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid (DNBA) ist nicht nur für die Derivatisierung von Alkoholen und Phenolen, sondern auch für die Charakterisierung von Aminen unter Pyridin-Katalyse vorzüglich geeignet. Die polarographisch aktiven Derivate gestatten im DPP-Modus noch die Erfassung von 10^{-8} M Konzentrationen. Die erhaltenen Amide haben in der Regel überwiegend größere ϵ -Werte, die für die HPLC (UV-Detektor) und UV-Spektroskopie vorteilhaft sind.

3,5-Dinitrobenzoic acid anhydride as reagent for the characterization of drugs and for the activation of polarographically inactive compounds

Drugs with primary or secondary amino groups react with 3,5-dinitrobenzoic acid anhydride under catalysis of pyridine derivatives almost quantitatively to yield the corresponding amides which are reducible at the dropping mercury electrode (DME). 3,5-Dinitrobenzoic acid will be separated by thin layer chromatography. The limit of detection by DPP is in the range of 10^{-8} M. The electrode reaction is irreversible.

1. Einleitung

Für die Identifizierung von Arzneistoffen ist die Bildung von charakteristischen Derivaten unverzichtbar. Häufig wird die Schotten-Baumann-Reaktion, vorzugsweise mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid, zur Charakterisierung von Arzneistoffen mit alkoholischen und phenolischen Hydroxylgruppen bzw. Arzneistoffen mit primären oder sekundären aliphatischen bzw. aromatischen Aminogruppen herangezogen. 3,5-Dinitrobenzoylchlorid ist ein instabiles und unangenehm zu handhabendes Reagenz.

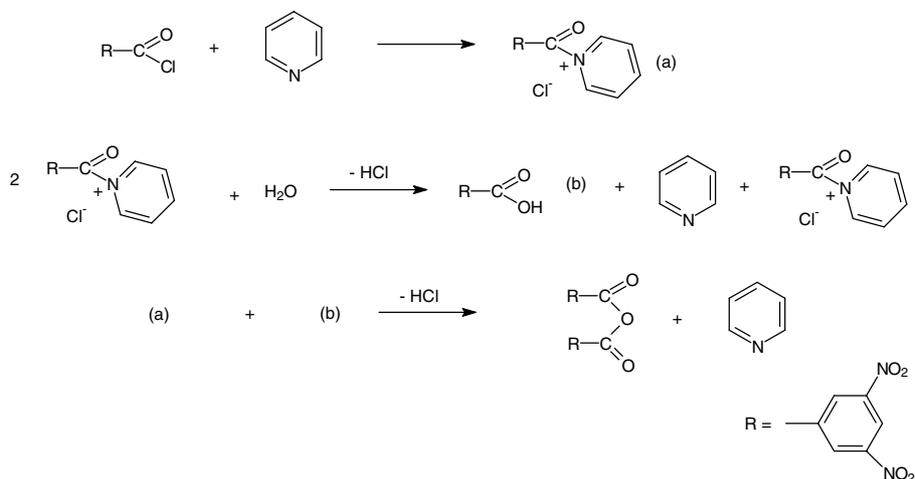
Nachdem 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid (DNBA) bequem und gefahrlos hergestellt werden kann [1] und über den Handel verfügbar ist, wurde es u. a. vom Deutschen Arzneimittel-Codex (DAC) für die Derivatisierung von n-Propanol übernommen. Dessen Dinitrobenzoylderivat schmilzt nach dem Umkristallisieren aus Heptan und Trocknen im Vakuum zwischen 72 und 75 °C.

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Die zuerst veröffentlichte eindeutige Synthese konnte inzwischen verbessert werden. Sie geht von 3,5-Dinitrobenzoylchlorid aus und verläuft unter Pyridin-Katalyse (Schema 1). Als Zwischenprodukt tritt die N-Acylpyridiniumverbindung auf. Die Rohausbeute liegt oberhalb von 92% d. Th. Nach Umkristallisieren aus Acetonitril schmilzt das reine Dinitrobenzoesäureanhydrid zwischen 220 und 223 °C. Diese Synthese ist erheblich preisgünstiger als diejenige unter Einsatz von *N,N*-Bis[2-oxo-3-oxazolidinyl]phosphorsäurediaminchlorid [2].

In Braunglasflaschen luftdicht aufbewahrt, tritt selbst nach jahrelanger Lagerung nur eine geringe Zersetzung von DNBA durch Hydrolyse ein. So zeigte ein ca. 15 Jahre gelagertes DNBA des Handels (Merck, Darmstadt) noch einen Gehalt von 81%. Das Reagenz ist nicht hygroskopisch, eine Probe nahm in 30 Tagen unter Standardbedingungen gelagert (Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit

Schema 1



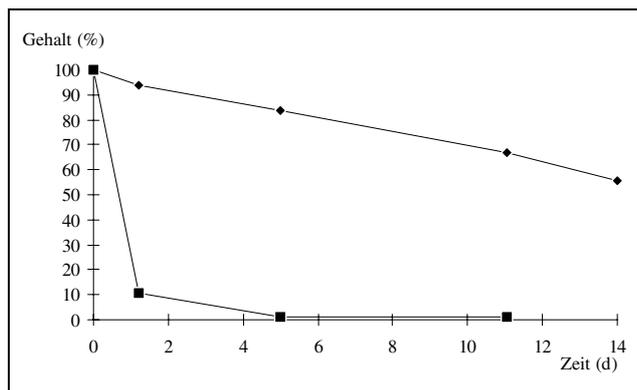


Abb. 1: Zerfall von DNBA (–) und 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (–) bei Lagerung (37 °C und Luftfeuchtigkeit 82%)

90 ± 3%) nur 0,13% Wasser auf. Die Lagerbeständigkeit im Vergleich mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid zeigt Abb. 1. Eine einfache selektive Gehaltsbestimmung des 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrids erfolgt durch Reaktion mit überschüssigem Piperidin und HPLC-Analyse des entstandenen Amids. Als innerer Standard dient 4-Dimethylaminobenzaldehyd. Die bei der Hydrolyse entstandene 3,5-Dinitrobenzoesäure reagiert unter diesen Bedingungen nicht.

Nicht untersucht wurde bisher die Eignung von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid zur Charakterisierung von Arzneistoffen mit primären und sekundären Aminogruppen. Die in Tabelle 1 aufgeführten DNBA-Derivate von willkürlich ausgewählten Arzneistoffen konnten leicht durch Reaktion des in Acetonitril gelösten Arzneistoffes unter Zugabe von DNBA und Pyridin gewonnen werden. Nach Aufarbeitung und Umkristallisieren im angegebenen Lösungsmittel zeigten die dc-reinen DNBA-Derivate charakteristische Schmelzpunkte.

Die bisher nicht beschriebenen farblosen bis gelblich-braunen Derivate schmelzen zwischen 30 °C und 273 °C. Als interessante Nebenreaktion wurde bei der Umsetzung von Diclofenac-Natrium dessen Cyclisierung zum entsprechenden Lactam beobachtet [3]. Die Enantiomerenproblematik bei Mexiletin, Baclofen und Prilocain wurde zurückgestellt.

Für die polarographische Bestimmung polarographisch inaktiver Arzneistoffe muss in einer schnellen Aktivierungsreaktion mit einem polarographisch aktiven Reagenz die quantitative Umsetzung angestrebt werden. Für Acylierungsreaktionen sind 4-Dialkylaminopyridine als hochwirksame Katalysatoren eingeführt worden [4]. Die Reaktionsbeschleunigung ist auf die Bildung von intermediär auftretenden *N*-Acy-4-dialkylaminopyridiniumsalzen zurückzuführen, deren Existenz in aprotischen Lösungsmitteln durch ¹H-NMR-Spektroskopie bewiesen worden ist [5]. Bei der Acylierung der in Tabelle 1 aufgeführten Arz-

Tabelle 1: Schmelzpunkte von 3,5-Dinitrobenzoesäureamiden

DNB-Derivate von	Schmelzpunkt der Derivate [°C]	Lösungsmittel
Mexiletin	182,0–183,5	CHCl ₃
Desipramin	67–69	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1 + 1 (v/v)
Prilocain	61,5–62,5	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1 + 1 (v/v)
Maprotilin	74–76	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1 + 1 (v/v)
Fenfluramin	30–40	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1 + 1 (v/v)
Baclofen	178–179	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1 + 1 (v/v)
Metoclopramid	211,5–213,5	CHCl ₃
Procaïnamid	191,0–192,5	CHCl ₃
Isoniazid	273,0	MeOH

Tabelle 2: Geschwindigkeit der Acylierung von Mexiletin-HCl (1 · 10⁻⁴ mol/l) mit DNBA (2 · 10⁻⁴ mol/l), Pyridin (3 · 10⁻⁴ mol/l) und DMAP (1 · 10⁻⁴ mol/l) bei 25 °C

Reaktionszeit (min)	Umsatz Mexiletin-HCl (%)
0	0
1	99,4
2	99,7
4	~100

Tabelle 3: Vergleich der ε-Werte der Modellschubstanzen und ihrer 3,5-Dinitrobenzoesäureamide

Arzneistoff	Molare Absorption ε der Ausgangsverbindung	Molare Absorption ε des 3,5-Dinitrobenzoesäureamids
Desipramin [6]	8965 (250 nm, MeOH)	20464 (250 nm, MeOH)
Fenfluramin	543 (264 nm, MeOH)	8912 (264 nm, MeOH)
Maprotilin	2535 (230 nm, MeOH)	32395 (230 nm, MeOH)
Mexiletin [7]	239 (264 nm, MeOH)	8796 (264 nm, MeOH)
Prilocain	6386 (230 nm, MeOH)	26384 (230 nm, MeOH)

neistoffe bestätigte sich die Eignung von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator. Bereits bei Raumtemperatur erfolgt in wenigen Minuten eine praktisch quantitative Umsetzung (vgl. Tabelle 2). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit 4-Pyrrolidinyloxyd erzielt.

Ersetzt man DNBA durch 3,5-Dinitrobenzoylchlorid, so verläuft bei gleicher Konzentration von DMAP und Pyridin die Acylierung wesentlich langsamer. Aus Abb. 2 ist ersichtlich, dass mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid die vollständige Acylierung ungefähr 20mal langsamer verläuft als mit dem Säureanhydrid.

Die Umsetzung mit DNBA ist auch für die UV-Spektroskopie vorteilhaft, wenn die genuinen Substanzen nur einen kleinen molaren Extinktionskoeffizienten ε haben. Die Koeffizienten der erhaltenen Amide sind zum größten Teil beträchtlich größer (vgl. Tabelle 3). Auch für die HPLC mit UV-Detektion bedeutet das Reagenz einen wichtigen Fortschritt.

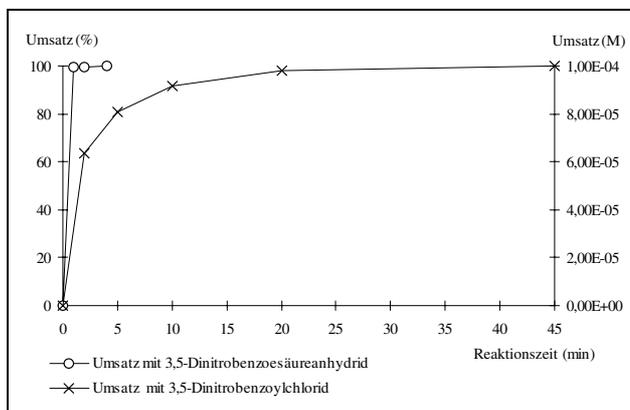
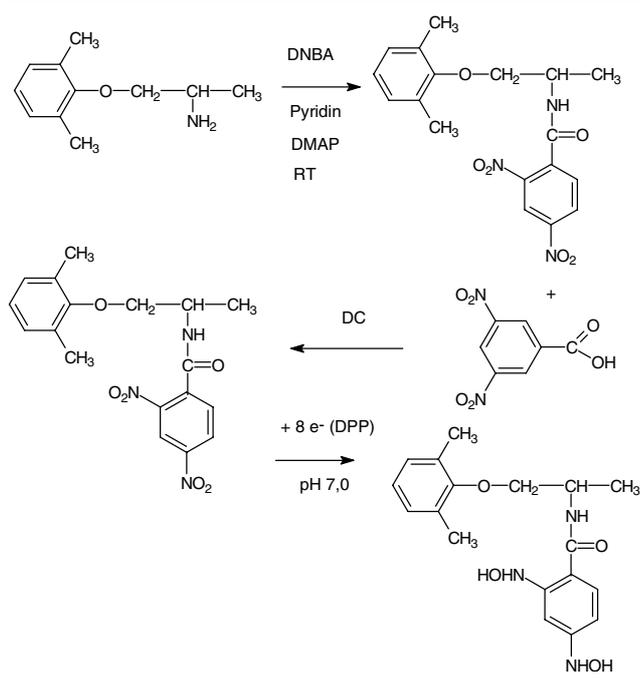


Abb. 2: Umsetzung von Mexiletin-HCl (1 · 10⁻⁴ mol/l) mit DNBA bzw. 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (2 · 10⁻⁴ mol/l) bei 25 °C mit Zusatz von Pyridin (4 · 10⁻⁴ mol/l) und DMAP (1 · 10⁻⁴ mol/l). Der Umsatz wurde durch HPLC bestimmt.

Schema 2



Die Brauchbarkeit des DNBA für die polarographische Aktivierung mit anschließender elektroanalytischer Bestimmung sei am Beispiel des Klasse-I-Antiarrhythmikums Mexiletin veranschaulicht (Schema 2, Abb. 3). Man versetzt das Mexiletin in Acetonitril mit DNBA, fügt Pyridin und DMAP-Lösung hinzu und lässt bei Raumtemperatur 15 min rühren. Dann überführt man die Lösung vollständig in einen Maßkolben, füllt mit demineralisiertem Wasser bis zur Eichmarke auf und bringt eine definierte Menge der Lösung auf eine Kieselgel-G-Platte. Auf einer Strecke von 10 cm trennt sich das Amid sauber von den Nebenprodukten. Der ausgeschnittene Substanzfleck wird in das Polarographiergefäß übergeführt und nach Zusatz von Methanol extrahiert. Nach Zugabe von BRP (pH 7,0) wird die Konzentration des Depolarisators bestimmt. Die Wiederfindungsrate liegt bei etwa 95,3% d. Th. \pm 3,7%.

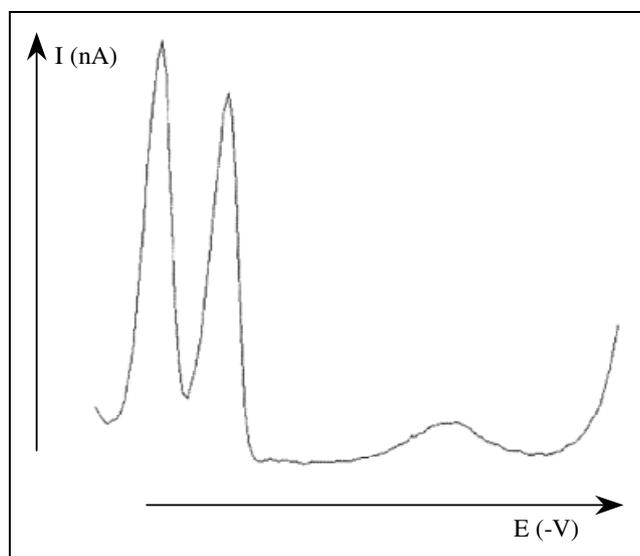


Abb. 3: Aktivierung und polarographische Bestimmung von Mexiletin (DPP-mode)

Somit ist ein systematischer Fehler von 4,7% gegeben, der durch die dünnschichtchromatographische Abtrennung des Derivats bedingt ist. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 10^{-8} M, infolge der Aufnahme von 2-4 Elektronen bis zur Hydroxylaminostufe beider Nitrogruppen. Aufwendiger ist die Abtrennung der 3,5-Dinitrobenzoesäure mit Hilfe eines stark basischen Anionenaustauschers. Die Wiederfindungsrate liegt in der gleichen Größenordnung. Die vorstehenden Untersuchungen machen deutlich, dass DNBA im Vergleich mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid große Vorzüge aufweist. Das Reagenz ist nicht nur für die Derivatisierung von Phenolen und Alkoholen geeignet [8], sondern auch zur Charakterisierung von Arzneistoffen mit primären und sekundären Aminogruppen. Darüber hinaus können mit dem sehr stabilen und gut haltbaren Reagenz Arzneistoffe mit kleinen ϵ -Werten, die mittels HPLC (UV-Detektor) oder durch UV-Spektroskopie bestimmt werden sollen, als DNB-Derivate wesentlich besser und genauer erfasst werden. Die polarographische Bestimmung der DNB-Derivate von elektrochemisch inaktiven Substanzen rundet das vorteilhafte Bild des Reagenzes ab. In einer folgenden Mitteilung werden die elektroanalytischen Befunde mit den DNB-Derivaten vorgestellt.

3. Experimenteller Teil

3.1. Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien besaßen, wenn nichts anderes angegeben ist, mindestens den Reinheitsgrad p.a.. Pufferlösungen wurden jeweils frisch hergestellt. Für die polarographischen Untersuchungen wurde ein Polarograph der Firma Metrohm AG (Herisau/CH), Modell VA Processor 695 mit VA Stand 696 verwendet. Sämtliche Polarogramme wurden gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (3 M-KCL als Elektrolyt) aufgenommen.

3.2. Synthese von DNBA

23,0 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (99 mmol) werden in 150 ml Acetonitril gelöst. Unter Eiskühlung und ständigem Rühren setzt man tropfenweise 8 ml (7,8 g, 99 mmol) Pyridin zu. Eine weiße Trübung zeigt die Bildung der *N*-Acyl-Pyridiniumverbindung an. Nach Zusatz von 89 μ l Wasser (49,5 mmol) bildet sich ein dicker weißer Niederschlag. Nach einer Stunde gibt man zur Entfernung des Pyridins die Reaktionsmischung in 300 ml verdünnte HCl (1,5%). Man wäscht noch einmal mit verdünnter HCl (1,5%). Der nach dem Absaugen erhaltene Niederschlag wird i. Vak. bei Raumtemperatur getrocknet (Rohausbeute 92%). Nach dem Umkristallisieren aus Acetonitril erhält man ein weißes kristallines Produkt vom Schmelzpunkt 220–223 °C (75% d. Th.).

3.3. Gehaltsbestimmung von DNBA

Ungefähr 50 mg Anhydrid werden in 25,0 ml Acetonitril gelöst. Dann werden 5,0 ml abgenommen, mit 20 μ l Pyridin und 45 μ l Piperidin versetzt und etwa 15 min unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur gehalten. Man setzt 1,0 ml internen Standard (4-Dimethylaminobenzaldehyd $5 \cdot 10^{-4}$ M) zu und füllt auf 100,0 ml mit Acetonitril/H₂O (1+1) auf. 10 μ l dieser Flüssigkeit werden zur Gehaltsbestimmung in den Chromatographen eingespritzt. Als Säule dient eine LiChrospher[®] RP18 (250 \times 4 mm, 100 μ m) der Firma Merck/Darmstadt. Das Fließmittel besteht aus einer Mischung von Acetonitril (Ultra Gradient HPLC Grade) (Baker/Holland) und 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,1; 50:50 (v/v). Die Flussrate beträgt 0,9 ml/min, detektiert wird bei einer Wellenlänge von 237 nm.

3.4. Umsetzung mit Aminen (Beispiel Mexiletin)

145 mg (0,7 mmol) Mexiletin-HCl werden in 1 ml Wasser gelöst und mit 50 ml Dioxan versetzt. Nach Zugabe von 530 mg (1,3 mmol) DNBA und 100 μ l (1,3 mmol) Pyridin wird über 30 min zum Sieden erhitzt, dann bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h ist die Reaktion beendet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgezogen und der Rückstand in CHCl₃ aufgenommen. Die CHCl₃-Phase wird zunächst 2 \times mit 0,1 M-HCl und danach 2 \times mit 0,1 M-NaOH ausgeschüttelt und anschließend 2 \times mit H₂O gewaschen, bis keine 3,5-Dinitrobenzoesäure und Pyridin mehr nachweisbar sind. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels werden die weißen Kristalle aus CHCl₃ umkristallisiert (Ausbeute 80% d. Th.). Die Struktur wird durch Elementaranalyse und Spektroskopie gesichert.

3.5. Aktivierung polarographisch inaktiver Substanzen (allgemeine Arbeitsvorschrift)

Zu 20 ml einer 10^{-3} M-Lösung des primären oder sekundärenamins in Acetonitril werden 16,3 mg ($4 \cdot 10^{-5}$ mol) 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid gegeben. Nach Zusatz von 7 μ l ($8 \cdot 10^{-5}$ mol) Pyridin und 120 μ l ($2 \cdot 10^{-5}$ mol) einer 4-Dimethylaminopyridin-Lösung (200 mg/ml in Acetonitril) läßt man bei Raumtemperatur 15 min rühren. Die Lösung wird vollständig in einen 25,0 ml-Maßkolben übergeführt und dieser mit demineralisiertem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Es werden je 10,0 μ l (Spritze 10 μ l, Hamilton, Bonaduz/CH) dieser Lösung auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (Folie Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck/Darmstadt) aufgetragen. Als mobile Phase dient ein Gemisch von NH₃ 25%, Methanol, Dichlormethan (1 + 14 + 85). Auf einer Strecke von 10 cm trennt sich das Amid sauber von den Nebenprodukten, es wird im ultravioletten Licht detektiert. Das Amid läuft etwas langsamer als die Fließmittelfront.

Der Substanzfleck wird sauber ausgeschnitten und in ein Polarographiergefäß übergeführt. Nach Zusatz von 5 ml Methanol wird die Substanz im Ultraschallbad 30 s desorbiert. Dann werden 5 ml BRP (pH 7,0) zugesetzt und der Depolarisator im Bereich von 0 bis -700 mV im DPP-Modus bestimmt. Die Konzentrationsberechnung erfolgt über eine Kalibriergerade des Amids. Zur Auswertung wird Peak 2 herangezogen, dessen Peakpotential zwischen -350 und -450 mV (Ag/AgCl) liegt.

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt a. M., für finanzielle Förderung.

Literatur

- 1 Oelschläger, H.; Fritsch, H.: Arch. Pharm. **317**, 834 (1984)
- 2 Palomo-Coll, A. L.; Cabre-Castellvi, J.: Synthesis **8**, 616 (1981)
- 3 Zajac, M.; Stanisz, B.; Musial, W.: Acta Pol. Pharm. **55**, 371 (1998)
- 4 Litvenko, L. M.; Kirichenko, A. I.: Dokl. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim **176**, 97 (1967)
- 5 Höfle, G.; Steglich, W.; Vorbrüggen, H.: Angew. Chem. **90**, 602 (1978)
- 6 von Bruchhausen, F. (Hrsg.): Hagers Handbuch, 5 Aufl., Bd. 7, S. 1206, Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1993
- 7 von Bruchhausen, F. (Hrsg.): Hagers Handbuch, 5 Aufl., Bd. 8, S. 1001, Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1993
- 8 Oelschläger, H.; Fritsch, H.: Arch. Pharm. **318**, 759 (1985)

Received July 13, 2001

Accepted August 1, 2001

Prof. Dr. Dres. h.c. H. Oelschläger
Institut für Pharmazie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Philosophenweg 14
D-07743 Jena
B8OEHE@rz.uni-jena.de