

Institut für Pharmazeutische Chemie¹ und Institut für Anorganische und Analytische Chemie² der Technischen Universität Braunschweig, Germany

Zur Farbreaktion von Chlorhexidin und Proguanil mit Hypobromit

K. GÖRLITZER¹, S. HUTH¹, P. G. JONES²

Eingegangen am 3. Juni 2004, angenommen am 6. Juni 2004

Prof. Dr. K. Görlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie, Beethovenstraße 55, D-38106 Braunschweig
k.goerlitzer@tu-bs.de

Pharmazie 60: 269–272 (2005)

Das Antimalariamittel Proguanil reagiert mit Hypobromit zum rot gefärbten (*E*)-3-[(4-Chlorphenyl)imino]-*N*-isopropyl-3*H*-1,2,4-triazol-5-amin (**6B**). Die Struktur von **6B** wurde durch Röntgenkristallanalyse bewiesen. Die bei der Identitätsprüfung des Desinfektionsmittels Chlorhexidindihydrochlorid Ph. Eur. mit Hypobromit beobachtete Rotfärbung dürfte auf einen entsprechenden Chromophor zurückzuführen sein.

Colour reaction of chlorhexidine and proguanil with hypobromite

The antimalarial agent proguanil reacts with hypobromite to yield the red coloured (*E*)-3-[(4-chlorophenyl)imino]-*N*-isopropyl-3*H*-1,2,4-triazol-5-amine (**6B**). The structure of **6B** was proven by X-ray. The red colour obtained by the test for the disinfectant chlorhexidinedihydrochloride Ph. Eur. with hypobromite is probably attributable to a corresponding chromophore.

1. Einleitung

Im Europäischen Arzneibuch, 4. Ausgabe, Grundwerk 2002 (Ph. Eur. 4.00), werden die Arzneistoffe Chlorhexidin-diacetat, -digluconat-Lösung und -dihydrochlorid zur Prüfung auf Identität in einer Lösung von Cetrimid gelöst. Nach Zusatz von konz. Natriumhydroxid-Lösung und Bromwasser entsteht eine dunkelrote Färbung. Die Struktur des bei dieser Farbreaktion gebildeten Produkts ist unbekannt. Laut Kommentar zum Europäischen Arzneibuch lässt sich die Farbreaktion mit geringerem Arbeitsaufwand unter Verzicht auf das Reagenz Cetrimid durch Lösen der jeweiligen Substanz in methanolischer 2 M-Kaliumhydroxid-Lösung und Zugabe von Bromwasser durchführen. Unter Beachtung von Umweltschutz und ökonomischen Gesichtspunkten kann die Farbreaktion durch den Einsatz einer Lösung von 0.01 M 1,3-Dibrom-5,5-dimethylhydantoin (DBH) in 0.1 M Natronlauge signifikant vereinfacht werden (Hilp 2002). Mit Hilfe der modifizierten Hypobromit-Reagenzien sollte die farbgebende Substanz isoliert und deren Struktur ermittelt werden.

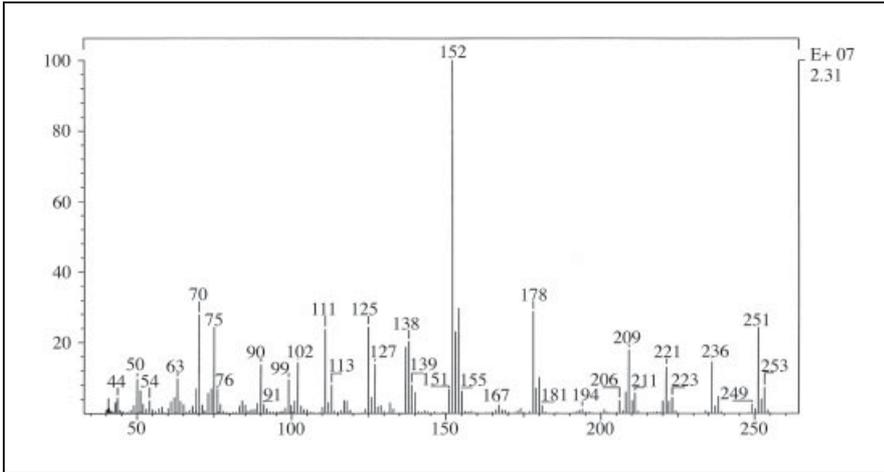
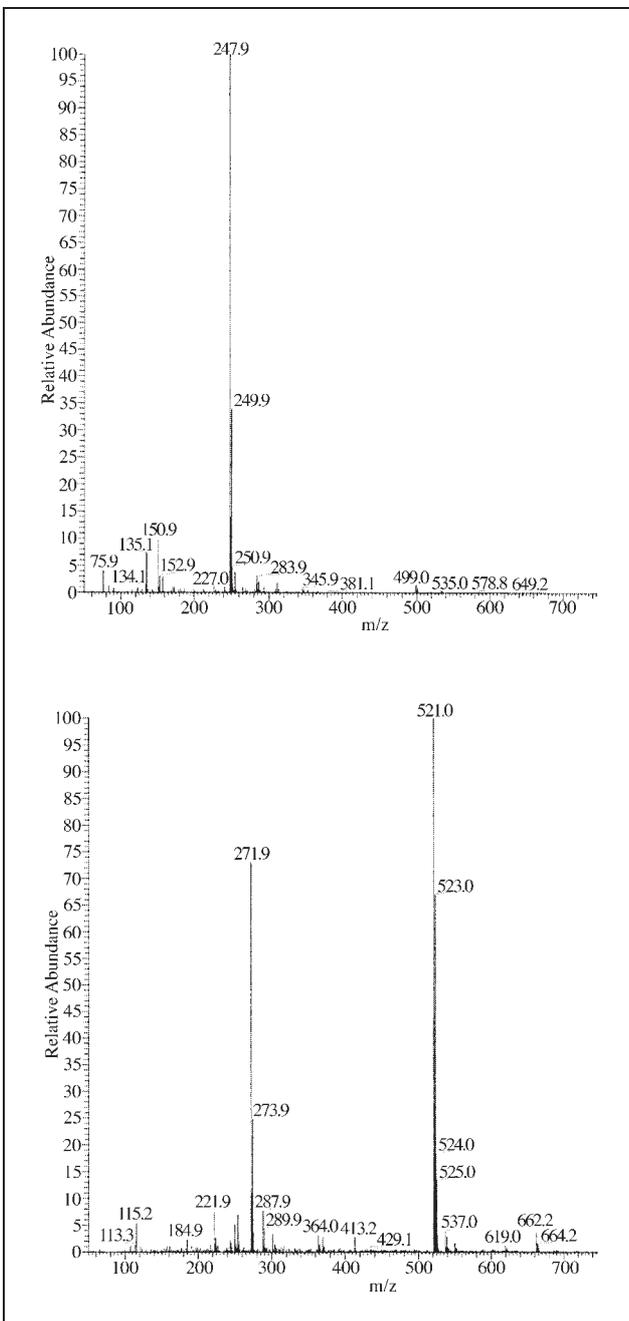
2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Die Reaktion von Chlorhexidin (**1**) mit methanolischer Kalilauge oder DBH in Natronlauge führte zu einem roten Farbstoffgemisch, das sich fc nicht auftrennen ließ. Das im 4. Nachtrag zum Europäischen Arzneibuch 2003 (Ph. Eur. 4.04) aufgenommene Antidiabeticum Metforminhydrochlorid und das Antimalariamittel Proguanilhydrochlorid besitzen wie Chlorhexidin eine Biguanid-Struktur. Deshalb wurde geprüft, ob auch diese beiden Arzneistoffe mit Hypobromit eine Rotfärbung geben. Mit Metformin (**2**) verlief die Reaktion negativ. Mit Proguanil (**3**) trat eine mit

Chlorhexidin vergleichbare Rotfärbung auf. Dies ist verständlich, da Chlorhexidin als Isomer von zwei miteinander verknüpften Proguanil-Einheiten anzusehen ist. Im Rahmen einer Harmonisierung der Untersuchungsmethoden des Arzneibuchs sollte daher zur Identitätsprüfung von Proguanilhydrochlorid der gleiche Text wie bei den Chlorhexidin-Monographien verwendet werden.

Die weiteren Untersuchungen wurden mit Proguanil fortgesetzt. Nach Aufarbeitung des Reaktionsansatzes unter milden Bedingungen und anschließende Reinigung durch FC konnte das rote Hauptprodukt als einheitliche, aber thermolabile Verbindung isoliert werden. Im EI-MS wird der Molpeak bei *m/z* 251 gefunden und das Isotopenmuster zeigt, dass die Substanz ein Chloratom enthalten muss (Abb. 1).

Die Elementaranalyse passt zu der Summenformel C₁₁H₁₄ClN₅. Die im IR-Spektrum auftretende Bande bei 1693 cm⁻¹ kann demnach nicht einer Carbonylvalenzschwingung eines Semicarbazids zugeordnet werden, das bei der Sakaguchi-Reaktion gebildet wird (Heesing und Hoppe 1967). Im ¹H NMR-Spektrum in CDCl₃ werden zwei Dubletts für die Protonen des 1,4-disubstituierten Aromaten registriert, die gegenüber den aromatischen Protonen der Proguanil-Base zu tieferem Feld verschoben sind. Im hohen Feld treten die Signale für die Protonen der Isopropyl-Gruppe im Vergleich mit denen des Edukts entschirmt in Resonanz. NH-Signale sind nicht zu erkennen. Demzufolge muss man von einer Dehydrierung in der Biguanid-Kette ausgehen. Das ¹³C NMR-Spektrum zeigt sieben Signale, die im DEPT-Spektrum auf vier Signale reduziert werden. Daher muss ein quartäres C, wahrscheinlich C-4', von dem Signal für die aromatischen Kohlenstoffe C-2' und C-6' überlagert sein. Alle Strukturvorschläge, sowohl für eine offenkettige als auch für eine cyclische Verbindung, sind

Abb. 1: EI-MS von **6B**Abb. 2: ESI-MS von **6B**; oben: negativ, unten: positiv

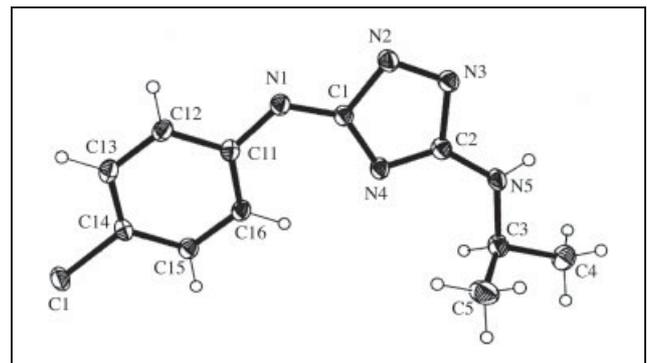
jedoch weder mit dem bei $\lambda_{\text{max}} = 415 \text{ nm}$ absorbierenden Chromophor noch mit den anderen spektroskopischen Daten in Einklang zu bringen.

Deshalb wurde die Molmasse der roten Substanz unter Anwendung eines schonenderen Ionisierungsverfahrens überprüft. Im ESI-MS wird der Molpeak im negativen Ionenmodus bei m/z 248 $[M - H]^-$ und im positiven Ionenmodus bei m/z 272 $[M + Na]^+$ bzw. bei m/z 521 $[2M + Na]^+$ gefunden. Im hochaufgelösten ESI-MS betrug die Präzisionsmasse 272.067 (ber. 272.067) $[M + Na]^+$. Daraus ergibt sich die neue korrekte Summenformel $C_{11}H_{12}ClN_5$. (Abb. 2).

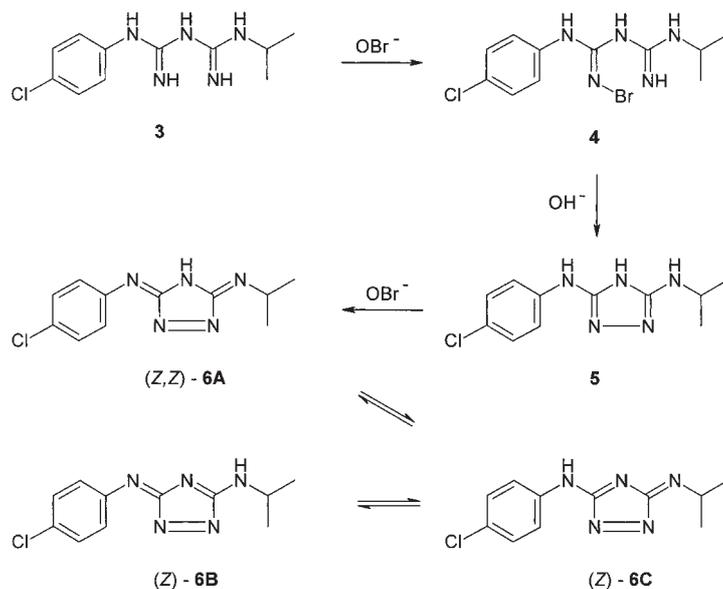
Das bedeutet, dass unter EI-Bedingungen eine Hydrierung des Farbprodukts eingetreten sein muss. Die Bildung der Dihydroverbindung während der Messung kann durch katalytische Hydrierung an den Nickel-haltigen Stahloberflächen der Ionenquelle mit Wasser als Wasserstoffdonor erklärt werden. Dieses Phänomen wird zuweilen beobachtet.³

Zu den spektroskopischen und analytischen Daten passt die Struktur **6A**. Arndt (1922) oxidierte Triazole mit Kaliumhexacyanoferrat(III) in alkalischer Lösung zu cyclischen Azoverbindungen und beschrieb das ziegelrote *N*-[5-Imino-4,5-dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-3-yliden]anilin.

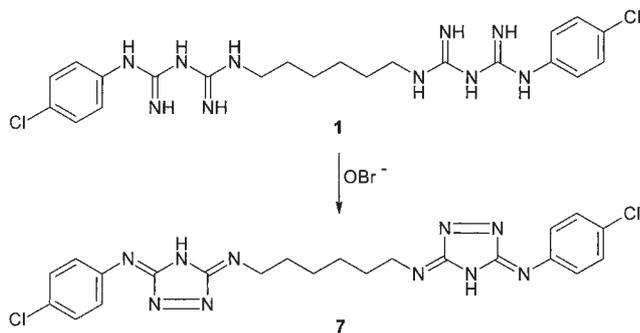
Durch Substitution eines Wasserstoffs einer NH-Gruppe von Proguanil durch Brom zu **4** und anschließende Eliminierung von Bromwasserstoff kann im ersten Schritt Cyclisierung zum farblosen Triazol **5** erfolgen. Hypobromit reagiert mit **5** unter Dehydrierung zum Diimino-1,2,4-triazol **6A**. Neben der Struktur **6A** lassen sich für das rote Produkt aber auch zwei Tautomere **6B** und **6C** sowie (*E,Z*)-Isomere formulieren (Schema 1).

Abb. 3: Röntgenkristallstrukturanalyse von **6B**

Schema 1



Schema 2



Von der roten Substanz ließen sich Einkristalle gewinnen. Deren Röntgenkristallstrukturanalyse beweist, dass das Tautomer **6B** mit (*E*)-Konfiguration vorliegt. Die zwei Ringe bilden einen Interplanarwinkel von $8,6^\circ$. Die Moleküle werden über Wasserstoffbrücken N5-H...N3 (kristallographische Numerierung) zu inversions-symmetrischen Dimeren geknüpft. Die rotgefärbte alkalische Lösung enthält wahrscheinlich das an N-4 deprotonierte **6A** (Abb. 3).

Das aus Chlorhexidin mit Hypobromit gebildete rote Produktgemisch sollte ebenfalls den 4,5-Dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-3,5-diimin-Chromophor besitzen, wie er z.B. in Substanz **7** zweimal enthalten ist (Schema 2).

3. Experimenteller Teil

3.1. Allgemeine Angaben

Schmp.: Büchi SMP 20 (Fa. Büchi Laboratoriumstechnik AG, CH-Flawil/Schweiz), nicht korrigiert. Elementaranalysen: C–H–N–O Elemental Analyzer 1106, Carlo Erba und CE Instruments FlashEA[®] 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest; die Ergebnisse lagen innerhalb der üblichen analytischen Grenzen. IR-Spektrum: ATI Mattson Genesis Series FT-IR-Spektrometer. UV-Spektrum: Philipps PU 8730 UV/VIS-Spektrophotometer. MS: Finnigan-MAT 8400-MSS I und Finnigan MAT 90 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig). Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS; Ionisationsenergie 70 eV. Elektrospray Ionisation (ESI)-MS. ¹H NMR

(400.13 MHz) und ¹³C NMR (100.61 MHz) (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig); Bruker AM-400 und Bruker Avance DRX-400 einschließlich der DEPT-Messungen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm nach der δ_{TMS} -Skala angegeben. HPLC: LiChrograph[®] L-6200 Gradientenpumpe, LiChrograph[®] L-4750 Dioden-Array-Detektor, LiChroCART[®] Auto-fix, PC 486 DX, D 6500 DAD System Manager Software. Trennsäule: LiChroCart[®] 125-4, LiChrosper[®] 100 RP-18 (5 μm), Vorsäule LiChroCart[®] 4-4, Select B; Flussrate 1.000 ml/min; isokratisch; Injektionsvolumen: 20 μl ; Detektion (DAD): 254 nm; Nettoretentionszeit (t_r) in min; Totzeit (t_m) in min bestimmt mit Thioharnstoff. Eluent: H₂O/MeCN (20:80); $t_m = 1.00$. FC: Kieselgel 60 (FA, Merck). Eluent: Petroläther/EtOAc (2:1). Dünnschicht-Chromatographie (DC): DC-Platten: Polygram[®] SIL G/UV₂₅₄-Fertigfolien für die DC, 40 \times 80 mm (Macherey-Nagel). Eluent: Heptan/THF/MeOH/H₂O (15:10:1:0.5).

3.2. (*E*)-3-[(4-Chlorphenyl)imino]-*N*-isopropyl-3*H*-1,2,4-triazol-5-amin (**6B**)

0.12 g (0.47 mmol) Proguanilhydrochlorid werden in 80 ml methanolischer KOH (2 mol/l) gelöst. Zu der Lösung werden 3.4 ml Bromwasser R gege-

Tabelle: Röntgenographische Daten für Verbindung **6B**

Temperatur	133(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Triklin
Raumgruppe	P(-1)
Gitterkonstanten	a = 4.7149(12) Å $\alpha = 71.171(6)^\circ$ b = 11.002(3) Å $\beta = 81.901(9)^\circ$ c = 11.699(3) Å $\gamma = 87.970(9)^\circ$
Volumen	568.6(3) Å ³
Z	2
Dichte (berechnet)	1.458 Mg/m ³
Absorptionskoeffizient	0.320 mm ⁻¹
F(000)	260
Kristallgröße	0.5 \times 0.2 \times 0.1 mm ³
θ -Bereich für die Datensammlung	1.86 to 30.03°
Limitierende Indizes	$-6 \leq h \leq 6, -15 \leq k \leq 15, -16 \leq l \leq 16$
Zahl der Reflexe	6601
Unabhängige Reflexe	3277 [R(int) = 0.1090]
Daten/Parameter	3277/158
Goodness-of-fit an F ²	1.041
R-Werte [I > 2 σ (I)]	R1 = 0.0452, wR2 = 0.1231
R-Werte (alle Daten)	R1 = 0.0549, wR2 = 0.1305
Größte Differenzpeaks	0.603 and -0.296 e. Å ⁻³

ben. Es entsteht eine blutrot gefärbte Lösung. Nach Abdestillieren des MeOH werden 50 ml H₂O hinzugefügt und 2× mit 50 ml Toluol ausgeschüttelt. Die organische Phase wird verworfen. Anschließend wird 4× mit 80 ml *t*-BuOMe ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, i. Vak. eingeengt und mittels FC gereinigt. Ausbeute: 5 mg (4%). Rote Nadeln, Schmp. 120 °C (EtOAc/Petroläther). ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.46 (d, 6H, J = 6, CH₃), 4.25 (sept, 1H, J = 6 Hz, CH), 7.41 (d, J = 9 Hz, 2-H, 6-H), 7.92 (d, J = 9 Hz, 3-H, 5-H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 22.23 (C-4,C-5), 47.40 (C-3), 128.79 (C-12, C-16, C-14), 129.24 (C-13, C-15), 133.04 (C-2), 134.63 (C-11), 173.48 (C-1). MS (EI): *m/z* (%) = 251 (25) [M + 2 H]⁺, 152 (100). MS (ESI): *m/z* = 272, [M + Na]⁺, 521 [2 × M + Na]⁺. Präzisionsmasse [M + Na]: Ber. 272.067; Gef. 272.067. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3434 cm⁻¹, 3190 (NH), 3055, 2952 (CH), 1693, 1607 (C=N, C=C). UV (Dioxan): λ_{max} (lg ϵ) = 415 nm (4.13). HPLC: t_{R} = 0.57. C₁₁H₁₂ClN₅ (251.7)

3.3. Röntgenstrukturanalyse von (E)-6B

Numerische Einzelheiten sind in der Tabelle zusammengestellt. *Datensammlung*: Der Kristall wurde in Inertöl montiert und in den Kaltgasstrom des Diffraktometers gebracht (Bruker SMART 1000 CCD). Es wurde mit Mo-K α -Strahlung gemessen. *Strukturverfeinerung*: Die Struktur wurde anisotrop gegen F² verfeinert (Programm SHELXL-97, G.M. Sheldrick, Universität Göttingen). Wasserstoffatome wurden wie folgt verfeinert: NH frei, starre idealisierte Methylgruppen, sonst mit einem Riding-Modell. Vollständige Daten (außer Strukturfaktoren) wurden unter der Nummer CCDC-239786 (6B) beim Cambridge Crystallographic Data Centre deponiert und können kostenlos angefordert werden vom Direktor, CCDC, 12 Union

Rd., Cambridge CB2 1EZ, UK (e-mail: deposit@chemcrys.cam.ac.uk), oder via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html.

³ Persönliche Mitteilung von Dr. U. Papke, Massenspektrometrie, Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig.

Danksagung: Für die großzügige kostenlose Überlassung von Paludrine Tabletten (Proguanil-hydrochlorid) danken wir AstraZeneca und von Diabetase 500 Filmtabletten (Metformin-hydrochlorid) danken wir Azupharma.

Literatur

- Arndt F (1922) Über einige Triazole. Ber Dtsch Chem Ges 55: 12–18.
 Europäisches Arzneibuch 4. Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart; Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn 2002, 1498–1503.
 Hartke K, Hartke H, Mutschler E, Rücker G, Wichtl M (2002) Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 2002, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, C 55–56.
 Heesing A, Hoppe K (1967) Sakaguchi- und Fearon-Reaktion: Die Struktur der Farbstoffe, ihr Bildungsmechanismus und die Spezifität der Reaktion. Chem Ber 100: 3649–3654.
 Hilp M (2002) Colour reactions of PH. EUR. for identification of drugs using 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin (DBH) instead of elemental bromide. Analytical methods of pharmacopoeias with DBH in respect to environmental and economical concern, part 10. Pharmazie 57: 172–175.