

Helmut Egg

Über den Nachweis von Benzodiazepinen mit der Farbreaktion nach Sawicki und Johnson

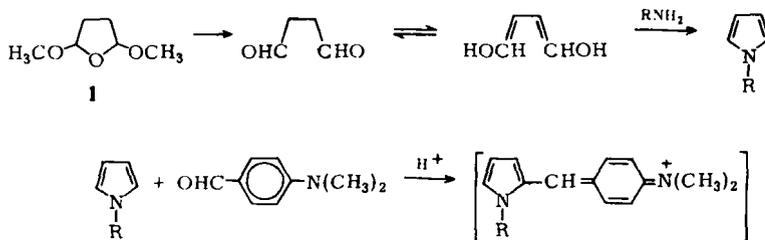
Aus dem Institut für Organische und Pharmazeutische Chemie der Universität Innsbruck (Eingegangen am 28. Mai 1975).

Die Untersuchung der Farbreaktion von 1,4-Benzodiazepinonen **2** mit 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran (**1**) und 4-Dimethylaminobenzaldehyd ergab, daß als Primärprodukte 2-(1-Pyrrolyl-acetylamino)-benzophenone gebildet werden. Es wird gezeigt, daß die Empfindlichkeit der Reaktion, die vor allem zum Nachweis von **2** auf DC-Platten geeignet ist, in gesetzmäßiger Weise von den Substituenten abhängig ist.

Detection of Benzodiazepines with the Colour Reaction by Sawicki and Johnson

The investigation of the colour reaction of 1,4-benzodiazepinones **2** with 2,5-dimethoxytetrahydrofurane (**1**) and 4-dimethylaminobenzaldehyde has shown that the primary products formed are 2-(1-pyrrolyl-acetylamino)-benzophenones. The sensitivity of this reaction, which is useful for the detection of **2** on thin-layer plates, depends on the substituents of **2**.

In einer 1970 von *Haefelfinger*¹⁾ publizierten Arbeit über den Nachweis primärer Amine auf Dünnschichtplatten mittels der Farbreaktion von *Sawicki und Johnson*²⁾ (Schema 1) wird erwähnt, daß auch einige Benzodiazepine trotz des Fehlens einer



Schema 1

1 P. Haefelfinger, J. Chromatogr. (Amsterdam) 48, 184 (1970).

2 F. Sawicki und H. Johnson, Chemist-Analyst 55, 101 (1966).

primären Aminogruppe positiv reagieren. Die Benzodiazepine wurden auf Silicagelschichten mit Hilfe der üblichen mobilen Phasen chromatographiert. Nach dem Entwickeln wurden die DC-Platten mit einer 1 proz. Lösung von 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran (**1**) in Eisessig besprüht und 5–10 min auf 100° erwärmt. Bei Diazepam und Nitrazepam führte anschließendes Besprühen mit einer 2 proz. Lösung von 4-Dimethylaminobenzaldehyd in Eisessig/konz. HCl zur Ausbildung rotvioletter Flecke. Als Erklärung für dieses Verhalten führt der Autor an, daß es sich hier um Verbindungen handelt, welche „durch Spaltung oder Umwandlung in primäre Amine übergeführt werden können.“ Exakte Untersuchungen über die bei dieser Reaktion entstehenden Produkte, die für das Auftreten der Farbe verantwortlich sind, liegen allerdings nicht vor. Diese Lücke wurde mit der vorliegenden Studie geschlossen, deren Ziel es war, die beim Umsatz von Benzodiazepinen mit **1** gebildeten Reaktionsprodukte zu isolieren und ihre Struktur zu ermitteln.

Orientierende Vorversuche mit rund 30 Benzodiazepinen der in Abb. 1 dargestellten Strukturen ergaben, daß ausschließlich 2,3-Dihydro-1H-benzo-f-1,4-diazepin-2-

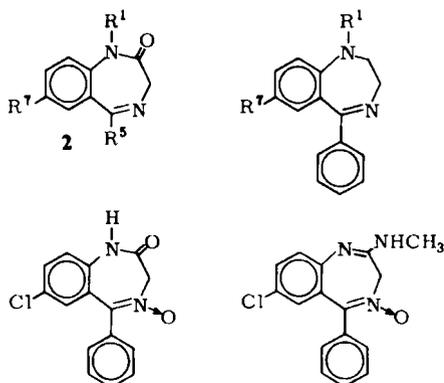


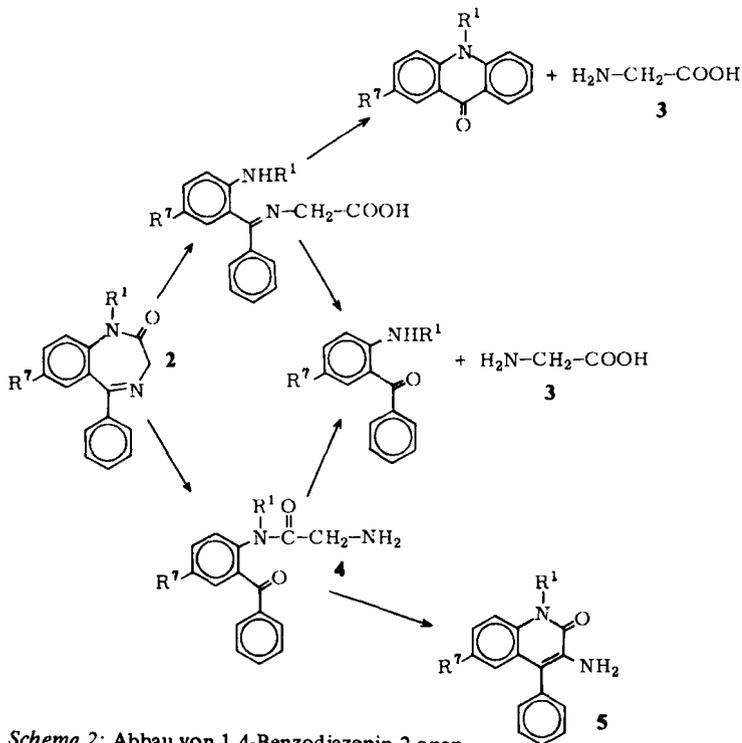
Abb. 1

one **2** eine positive Reaktion mit **1** und 4-Dimethylaminobenzaldehyd zeigen. Dieser Befund steht in Einklang mit den von *Haefelfinger* mitgeteilten Resultaten.

Als Grundlage für eine Prognose über den Reaktionsablauf diene das Schema 2, welches die bekannten Abbau- und Umlagerungsreaktionen von **2** wiedergibt. Danach sind drei Abbau- bzw. Umlagerungsprodukte mit primärer Aminogruppe (**3**, **4** und **5**) möglich, die beim Umsatz mit **1** zur Bildung von **6**, **7** oder **8** führen könnten (Abb. 2).

Da **6** und **8** gezielt aus **3**³⁾ und **5** synthetisiert werden können, sollte es möglich sein, bereits durch einfache dc Vergleiche wichtige Informationen über die Reaktion zu erhalten. Die in Tab. 1 angeführten **2**, die entsprechenden Chinolone **5** und

3 J. Gloede, K. Poduska, H. Gross und J. Rudinger, Collect. czechoslov. chem. Commun. 33, 1307 (1968).



Schema 2: Abbau von 1,4-Benzodiazepin-2-onen

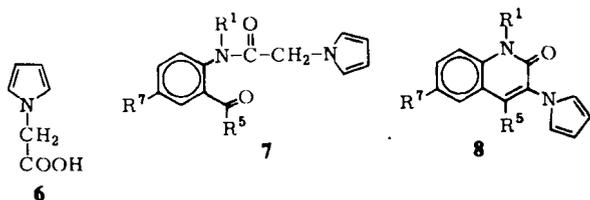


Abb. 2

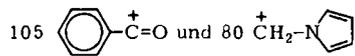
Tab. 1: Umgesetzte Diazepine

		R^1	R^5	R^7
2a	Nitrazepam	H	Phenyl	NO_2
2b	Bromazepam	H	2-Pyridyl	Br
2c	Clonazepam	H	o-Chlorphenyl	NO_2
2d	Diazepam	CH_3	Phenyl	Cl

Glycin (3) wurden mit überschüssigem 1 in Eisessig am siedenden Wasserbad umgesetzt und anschließend auf Silicagel chromatographiert. Dabei ergab sich eindeutig, daß 6 und 8 als mögliche Reaktionsprodukte ausscheiden. Die in durchweg sehr schlechten Ausbeuten aus 2 gebildeten Pyrrole, deren Reindarstellung mittels präp. DC erfolgte, wurden auf spektroskopischem Wege als 2-(1-Pyrrolyl-acetylamino)-benzophenone 7 identifiziert.

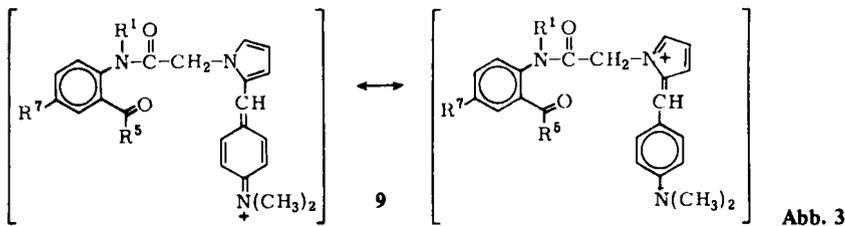
Die H-NMR-Spektren der Pyrrole 7a-c zeigen in Einklang mit der angenommenen Struktur ein Singulett bei $\delta = 4,7-4,8$ ppm für $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ und 2 Triplets bei $\delta = 6,3$ und $6,7$ ppm ($J = 2,2$ Hz) für den Pyrrolrest. Ein davon abweichendes Aussehen hat das Spektrum des von Diazepam abgeleiteten Pyrrols 7d, das überraschenderweise für die $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ -Gruppierung ein AB-System bei $\delta = 4,42$ und $4,56$ ppm mit $J_{AB} = 15$ Hz aufweist.

Das Massenspektrum von 7d zeigt neben dem Molekül-Ion mit $m/e = 352$ folgende wichtige Fragmente: 245 (2-Methylamino-5-chlorbenzophenon),



Die IR-Spektren zeigen im Carbonylbereich für 7a-c drei Banden bei 1690, 1650 und 1570 cm^{-1} (Benzophenon, Amid I und Amid II), für 7d eine einzige, sehr starke Bande bei 1670 cm^{-1} .

Die Pyrrole 7 wurden durch Kupplung mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in Eisessig/HCl konz. in spontaner Reaktion in rotviolette Farbstoffe umgewandelt, welchen die nicht näher untersuchte Struktur 9 zugeschrieben wird:



Die Absorptionsmaxima liegen, abgesehen von einzelnen geringen Abweichungen, bei 560 nm, die molaren Extinktionskoeffizienten zeigen eine deutliche Abhängigkeit vom Substituenten R^1 . Bei $R^1 = \text{H}$ liegen die ϵ -Werte zwischen 5000 und 10000, bei $R^1 = \text{CH}_3$ zwischen 20000 und 25000.

Reaktionsmechanismus

Vermutlich wird die Bildung von 7 durch den elektrophilen Angriff eines Carbonyl-C-Atoms des intermediär aus 1 gebildeten Succindialdehydes am N-4 des Diazepinrings eingeleitet, gefolgt von der Öffnung der Azomethinbindung und Ausbildung des Pyrrolrings durch Abspaltung von 2 Molen Wasser. Weniger plausibel erscheint

eine primär eintretende hydrolytische Spaltung der Azomethinbindung durch die Einwirkung des heißen Eisessigs und anschließende Reaktion der dabei gebildeten primären Aminogruppe mit Succindialdehyd. Benzodiazepinone 2 sind nämlich im allgemeinen stabil gegenüber Eisessig⁴⁾ und bleiben auch bei mehrstdg. Erwärmen in Eisessig unverändert.

Die Reaktivität von 2 gegenüber 1 ist in gesetzmäßiger Weise von den Substituenten R¹ und R⁵ abhängig. Diese Gesetzmäßigkeiten wurden einerseits von den photometrisch bestimmten Produktausbeuten, andererseits den Nachweisgrenzen auf Dünnschichtplatten abgeleitet.

Bei R⁵ handelt es sich in der Hauptsache um Phenyl oder o-substituiertes Phenyl. Es zeigte sich, daß mit zunehmender Größe des o-Substituenten die Reaktivität von 2 sehr stark absinkt. Bei dieser Reaktivitätsminderung spielen sicherlich neben mesomeren und induktiven Effekten auch sterische Faktoren eine wichtige Rolle. Durch o-Substituenten wird der 5-Phenylring mehr oder weniger aus der Molekülebene herausgedreht und dadurch nicht nur die Molekülgeometrie, sondern auch die π -Elektronenverteilung verändert. Der Zusammenhang zwischen der Reaktivität und den von Seiler⁵⁾ im Rahmen von Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen aus UV-Daten errechneten Verdrillungswinkeln φ ist aus Tab. 2 ersichtlich.

Tab. 2: Abhängigkeit der Ausbeuten bzw. der Nachweisgrenzen von den Substituenten R¹ und R⁵ der Benzodiazepine 2 beim Umsatz mit 1 und 4-Dimethylaminobenzaldehyd

R ¹	R ⁵	R ⁷	φ	Ausbeute (%)	Nachweisgrenzen (μg)
H	Phenyl	Cl	28°	3	0,05
H	o-Fluorphenyl	Cl	32°	1	0,1
H	o-Chlorphenyl	Cl	48°	0,1	1
H	o-Bromphenyl	Cl	55°		1
H	p-Chlorphenyl	Cl	28°		0,1
CH ₃	Phenyl	Cl	28°	0,8	0,1
CH ₃	o-Fluorphenyl	Cl	32°	0,3	0,5
CH ₃	o-Chlorphenyl	Cl	48°	0,02	10
CH ₃	o-Tolyl	Cl	53°		10
H	Phenyl	NO ₂		3	0,05
H	o-Fluorphenyl	NO ₂			0,1
H	o-Chlorphenyl	NO ₂			1
CH ₃	Phenyl	NO ₂		0,8	0,1
CH ₃	o-Fluorphenyl	NO ₂			0,5
H	Phenyl	H			0,05

4 R.I. Fryer und L.H. Sternbach, J. org. Chemistry 30, 524 (1965).

5 P. Seiler, interne Mitteilung

So wird z. B. durch o-Fluor ($\varphi = 32^\circ$) die Reaktionsgeschwindigkeit auf etwa die Hälfte des bei unsubstituiertem Phenyl ($\varphi = 28^\circ$) beobachteten Wertes, bei o-Chlor ($\varphi = 48^\circ$) auf ca. ein Zwanzigstel erniedrigt. p-Chlor, das keinen Einfluß auf den Verdrehungswinkel hat ($\varphi = 28^\circ$), beeinflußt auch nicht die Reaktionsgeschwindigkeit.

R^1 kann bei den hier untersuchten 2 H oder CH_3 vorstellen. Eine stabilisierende Wirkung von Substituenten in 1-Stellung wird in der Literatur⁶⁾ erwähnt und ist auch bei dieser Reaktion feststellbar. Bei $R^1 = \text{CH}_3$ sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit auf ein Viertel der an unsubstituierten 2 ($R^1 = \text{H}$) ermittelten Werte.

Von R^7 wurde kein nennenswerter Einfluß auf die Reaktion festgestellt.

Die experimentellen Arbeiten wurden in der Kontrollabteilung der Firma F. Hoffmann – La Roche & Cie., Basel durchgeführt, der auch an dieser Stelle für die Möglichkeit zur Ausführung dieser Arbeit verbindlichst gedankt wird.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. *Arnold* und Herrn Dr. *Vetter* für die Aufnahme und Interpretation der NMR- und Massenspektren.

Beschreibung der Versuche

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von 7

10 mg 2 werden in 1 ml Eisessig gelöst und nach Zugabe von 0,01 ml 1 10 min am siedenden Wasserbad erwärmt.

- Für die Untersuchungen wird die Reaktionslösung mit Essigester auf 10,0 ml verdünnt. Schicht: Kieselgel GF₂₅₄ Merck, 0,25 mm. Mobile Phasen: Äther-Dichlormethan-Methanol (45 + 30 + 1) oder Essigester-Heptan (1 + 1). Sichtbarmachung: Besprühen mit einer 2 proz. Lösung von 4-Dimethylaminobenzaldehyd in Eisessig/HCl konz. (85 + 15).
- Zur Ausbeutebestimmung wird die Reaktionslösung mit 1 ml der 2 proz. 4-Dimethylaminobenzaldehydlösung versetzt, mit Eisessig auf 20,0 ml verdünnt und photometriert.

Reindarstellung von 7a mittels präp. DC

35 mg 2a wurden in 0,5 ml Eisessig mit 0,04 ml 1 30 min am siedenden Wasserbad erwärmt. Der Ansatz wurde auf Eis gegossen und mit Essigester extrahiert. Nach Verdampfen des Essigesters verblieben 45 mg eines braunen Öls, das größtenteils aus nichtumgesetztem 2a, wenig 7a und verschiedenen Zersetzungsprodukten bestand und mittels präp. DC aufgetrennt wurde: Schicht: Kieselgel Merck, 2 mm. Mobile Phase: Äther-Dichlormethan-Methanol (45 + 30 + 1). Strichförmige Auftragung der Lösung obigen Rohproduktes in 5 ml Dichlormethan.

Zur Gewinnung von spektroskopisch reinem 7a mußte die dc Reinigung zweimal wiederholt werden: 0,9 mg (2 % d. Th.)

In gleicher Weise wurden 7b-d hergestellt und gereinigt.

6 J.T. Carstensen, K.S.E.SU, P. Maddrell, J.B. Johnson und H.N. Newmark, Bull. of the Parenteral Drug Association 25, 193 (1971).