

**3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid als Reagenz zur  
Charakterisierung von Arzneistoffen und polarographische  
Bestimmung der DNB-Derivate**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Wolfgang Köhler  
geboren am 07.05.1968 in Dresden

## Gutachter

1. Prof. Dr. Dr. mult. h.c. H. Oelschläger, Jena
2. Prof. Dr. J. Volke, Prag
3. Prof. Dr. G. Scriba, Jena

Tag der Doktorprüfung: 04.07.2001

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.10.2001

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1996 bis April 2001 im Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

Meinem Doktorvater

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H. Oelschläger

danke ich für die Auswahl und Überlassung des Themas und für die zahlreichen wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

Danken möchte ich meinen Mitarbeitern am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie für ihre gern geübte Kollegialität, besonders den Herren Dr. A. Seeling und Apotheker J. Wange für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Knoth für seine wertvolle Hilfe, besonders bei polarographischen Fragestellungen und seinen steten freundschaftlichen Rat.

---

---

## Inhaltsverzeichnis

1	<b>Einleitung</b> .....	4
1.1	Indirekte Polarographische Analyse .....	4
1.2	3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid.....	14
2	<b>Problemstellung</b> .....	18
3	<b>Ergebnisse und deren Diskussion</b> .....	20
3.1	Untersuchungen zum Reagenz 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid .....	20
3.1.1	Synthesen von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid .....	20
3.1.2	Gehaltsbestimmung von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid .....	22
3.1.3	Stabilität von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid.....	23
3.2	Untersuchungen zur Umsetzung von Aminen.....	25
3.2.1	Qualitative Umsetzung der Modellsstanzen.....	25
3.2.2	Quantitative Umsetzung im analytischen Maßstab .....	28
3.3	Polarographische Untersuchungen .....	34
3.3.1	Vergleich der Polarogramme (DC <sub>T</sub> , DPP) .....	34
3.3.2	Stabilität der Depolarisatoren im Katholyten .....	39
3.3.3	Einfluß des pH-Wertes auf die Halbstufenpotentiale.....	40
3.3.4	Konzentrationsabhängigkeit des Grenz- bzw. Spitzenstromes .....	43
3.3.5	Einfluß von Tensiden und Ionenstärke.....	47
3.3.6	Abhängigkeit von der Temperatur .....	48
3.3.7	Logarithmische Analyse der polarographischen Kurven .....	49
3.3.8	Bestimmung des Elektronenverbrauches .....	52
3.3.8.1	Korrelationsverfahren.....	52
3.3.8.2	Coulometrie.....	53
3.3.9	Ergebnisse der polarographischen Untersuchungen.....	55
3.4	Polarographische Gehaltsbestimmung von Aminen.....	58
3.4.1	Abtrennung der 3,5-Dinitrobenzoesäure mit Hilfe eines basischen Ionenaustauschers.....	58
3.4.2	Dünnschichtchromatographische Abtrennung .....	58
3.5	Weitere Anwendungen für Derivatisierungen mit 3,5-Dinitrobenzoe- säureanhydrid.....	62

---

---

4	<b>Experimenteller Teil</b> .....	64
4.1	Analytische Methoden .....	64
4.1.1	Elektrochemische Methoden .....	64
4.1.1.1	Polarographie (DC <sub>T</sub> , DPP) .....	64
4.1.1.2	Coulometrie bei kontrolliertem Potential .....	65
4.1.2	Chromatographische Methoden .....	65
4.1.2.1	Dünnschichtchromatographie .....	65
4.1.2.2	HPLC .....	66
4.1.3	Spektroskopische Methoden .....	66
4.1.3.1	IR-Spektroskopie .....	66
4.1.3.2	UV/VIS-Spektroskopie .....	66
4.1.3.3	Massenspektroskopie .....	66
4.1.4	Gehaltsbestimmung von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid .....	67
4.1.5	Bestimmung der Umsatzrate und -geschwindigkeit .....	67
4.1.6	Indirekte polarographische Gehaltsbestimmung von Aminen nach Trennung der Reaktanten durch Ionenaustauschchromatographie .....	68
4.1.7	Indirekte polarographische Gehaltsbestimmung von Aminen nach Trennung der Reaktanten durch Dünnschichtchromatographie .....	69
4.2	Präparativer Teil .....	70
4.2.1	3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid (Dicyclohexylcarbodiimid-Methode) .	70
4.2.2	3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid (nach Oelschläger 1984 <sup>44</sup> ) .....	72
4.2.3	<i>N</i> -[2-(Diethylamino)ethyl]-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)-amino]benzamid (DNB-Procaïnamid) .....	72
4.2.4	<i>N</i> '-(3,5-Dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazid (DNB-Isoniazid) .....	73
4.2.5	<i>N</i> -[3-(10,11-Dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[ <i>b,f</i> ]azepin-5-yl)propyl]- <i>N</i> -methyl-3,5- dinitrobenzamid (DNB-Desipramin) .....	74
4.2.6	( <i>RS</i> )- <i>N</i> -{1-[(2-methylphenyl)carbonyl]ethyl}-3,5-dinitro- <i>N</i> - propylbenzamid (DNB-Prilocain) .....	75
4.2.7	( <i>RS</i> )-3-(4-Chlorphenyl)-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)-amino]butansäure (DNB-Baclofen) .....	76
4.2.8	1-(2,6-Dichlorphenyl)-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-on .....	77

---

---

4.2.9	5-Chlor- <i>N</i> -[2-(diethylamino)ethyl]-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)amino]-2-methoxybenzamid (DNB-Metoclopramid) .....	78
4.2.10	( <i>RS</i> )- <i>N</i> -[2-(2,6-dimethylphenoxy)-1-methylethyl]-3,5-dinitrobenzamid (DNB-Mexiletin) .....	79
4.2.11	<i>N</i> -[3-(9,10-Dihydro-9,10-ethanoanthracen-9-yl)propyl]- <i>N</i> -methyl-3,5-dinitrobenzamid (DNB-Maprotilin) .....	80
4.2.12	( <i>RS</i> )- <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -{1-methyl-2-[3-(trifluormethyl)-phenyl]ethyl}-3,5-dinitrobenzamid (DNB-Fenfluramin).....	81
4.2.13	1-(3,5-Dinitrobenzoyl)-piperidin.....	82
5	<b>Zusammenfassung</b> .....	83
6	<b>Abkürzungen</b> .....	87
7	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	89
8	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	91
9	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	92

## 1 Einleitung

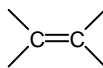
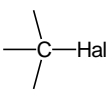
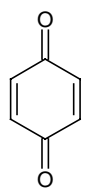
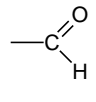
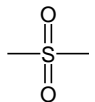
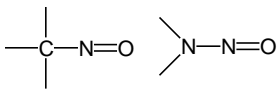
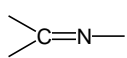
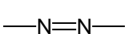

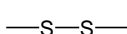
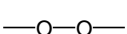

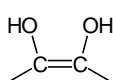
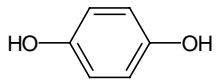
### 1.1 Indirekte Polarographische Analyse

1922 veröffentlichte der spätere tschechische Nobelpreisträger (Nobelpreis 1959) Jaroslav Heyrovsky in Prag die Ergebnisse seiner Beobachtungen bei der Aufnahme von Strom-Spannungs-Kurven von Alkali- und Erdalkalisalzlösungen mit der Quecksilbertropfelektrode (dropping mercury electrode, DME). Die Kurven zeigten exponentielle Anstiege bei einem für jedes Kation charakteristischen Potential<sup>1</sup>. Mit seinen jahrelangen Forschungen auf diesem Gebiet fügte er den schon bekannten elektrochemischen Untersuchungsmethoden<sup>2</sup> wie Potentiometrie, Coulometrie und Konduktometrie ein neues zukunftsträchtiges Kapitel hinzu. Die von ihm und seinen Mitarbeitern entwickelte Meßmethode der Aufnahme von Strom-Spannungs-Kurven (I-E-Kurven) in Anwesenheit von reduzierbaren oder oxidierbaren Analyten mit der DME bezeichnet man als „Polarographie“. Der spätere Begriff Voltammetrie schließt auch Verfahren mit stationären Elektroden ein. Meilensteine in der Entwicklung polarographischer Meßtechniken waren die Einführung der Wechselstrompolarographie und 1960 der Differentiellen Pulspolarographie<sup>3</sup> (DPP). Während bei der klassischen Gleichstrompolarographie die übliche Nachweisgrenze in Abhängigkeit vom Depolarisator bei ungefähr  $10^{-4}$  molaren Lösungen liegt, sind mit der DPP Bestimmungen bis in den Bereich von  $10^{-8}$  M möglich. Mit der Inversen Voltammetrie am hängenden Quecksilbertropfen wird der Meßbereich darüber hinaus erweitert.

<b>Methode</b>	<b>Nachweisgrenzen</b> (für organische Analyte)
Gleichstrompolarographie	$10^{-5}$ M
Differenzpulspolarographie	$10^{-7}$ M bis $10^{-8}$ M
Wechselstrompolarographie	$10^{-6}$ M bis $10^{-7}$ M
Adsorptive Stripping-Voltammetrie	bis $10^{-10}$ M

Tab. 1: Nachweisgrenzen polarographischer Verfahren<sup>4</sup>

Ursprünglich nur zur Bestimmung anorganischer Kationen gedacht, setzte sich nach der Erweiterung auf Anionen in den folgenden Jahren auch die polarographische Bestimmung organischer Substanzen durch. Kationen, Anionen und organische Substanzen wandern hierbei durch Diffusion zur Elektrode.

<b>reduzierbare Gruppen</b>		
Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen  (in Konjugation mit Carbonylfunktion)	Kohlenstoff-Halogen-Bindungen  (Hal = Cl, Br, I)	Chinone 
Aldehyde, Ketone  (teilweise)	Sulfone 	C- und N-Nitrosoverbindungen 
Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindungen 	Stickstoff-Stickstoff-Doppelbindungen 	Sulfoxide  (in Konjugation mit arom. Ring)
Disulfide 	Peroxide, Hydroperoxide 	Nitroverbindungen 
<b>oxidierbare Gruppen</b>		
Endiole 	Hydrochinone 	

**Tab. 2:** An der DME polarographisch aktive Molekülgruppen (Auswahl)

Durch die Erweiterung auf organische Moleküle gewann die Polarographie auch für die Arzneimittelanalytik an Bedeutung. In der polarographischen Arzneistoffanalyse dominieren Reduktionsreaktionen. Oxidativ lassen sich wegen der Auf-



---

---

lösung des Quecksilbers ab etwa +0,2 V (gegen Ag/AgCl) nur wenige Moleküle, wie z. B. Ascorbinsäure, elektrochemisch bestimmen. Eine Ascorbinsäurebestimmung dieser Art war in die Tschechoslowakische Pharmakopöe aufgenommen worden.

Die Vorteile der polarographischen Verfahren gegenüber anderen Methoden der Arzneimittelanalyse liegen in ihrer Selektivität bei gleichzeitig hoher Empfindlichkeit<sup>5</sup>. So brauchen in den meisten Fällen bei der Analyse von Arzneizubereitungen polarographisch inaktive Hilfsstoffe oder gelegentlich sogar polarographisch aktive Wirkstoffe mit abweichendem Halbstufenpotential vor der Bestimmung nicht abgetrennt zu werden. Dadurch entfallen sonst oft notwendige zeitraubende Trennoperationen. Im Grundelektrolyten unlösliche Hilfsstoffe stören ebenfalls nicht, denn der Arzneistoff kann auch in Suspension an der DME vermessen werden. Bei Anwesenheit mehrerer polarographisch aktiver Substanzen, die sich nicht hinreichend im Halbstufenpotential unterscheiden, ist allerdings eine vorherige Trennung, z. B. durch Säulenchromatographie, erforderlich.

Des Weiteren bietet sich die Kombination der Elektroanalytik mit analytischen Trennverfahren an. Sogenannte elektrochemische Detektoren stellen in Kombination mit HPLC und CE eine Alternative zu herkömmlichen Detektoren dar<sup>4</sup>. Einen historischen Überblick über die Entwicklung elektrochemischer Detektoren für die HPLC, die in den frühen 70er Jahren begann, gibt Kissinger<sup>6</sup>. Die weiteste Verbreitung haben amperometrische Detektoren gefunden, die bei niedrigen Nachweisgrenzen eine hohe, dem UV-Detektor überlegene Selektivität bieten. Die Detektoren arbeiten meist mit Festkörperelektroden, an denen grundsätzlich sowohl Oxidationen als auch Reduktionen möglich sind. Da aber im reduktiven Bereich die Entfernung des in der mobilen Phase gelösten Sauerstoffs Probleme bereitet, basieren die meisten praktischen Anwendungen auf Oxidation der Analysensubstanzen. So können z. B. Phenole, aromatische Amine und tertiäre Alkylamine erfaßt werden. Von großer Bedeutung im Sektor Militärmedizin ist die Möglichkeit, Pockenviren, z.B. Kamel-, Kuh- oder Affenpocken, und Vacciniaviren in einem komplizierten Verfahren mit Hilfe eines elektro-

---

---

chemischen Detektors in geringsten Konzentrationen zu detektieren. Als Elektrode dient eine vergütete Kupferelektrode. Die Reaktion basiert auf der elektrochemischen Messung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Interaktion des infektiösen Materials mit einer Peroxidase. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt im Bereich von  $10^5$  PFU/ml (plaque forming units)<sup>7</sup>.

Neben der Gehaltsbestimmung ermöglicht die Polarographie aufgrund der Lage des Halbstufenpotentials grundsätzliche Aussagen zum Reduktionsmechanismus an der DME und damit zur Struktur des betreffenden Moleküls.

Voraussetzung für die Bestimmung einer organischen Substanz an der DME ist, wie bereits dargelegt, das Vorhandensein einer elektrochemisch aktiven Gruppe im Molekül. Tab. 2 führt die wesentlichen an der DME reduzierbaren und oxidierbaren Gruppen auf und weist damit auf die limitierten Einsatzmöglichkeiten der Polarographie hin.

Schon in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde versucht, durch vorgelagerte quantitativ verlaufende chemische Reaktionen mit polarographisch aktiven Substanzen eine elektrochemisch aktive Gruppe in das Molekül einzuführen und somit inerte Substanzen einer polarographischen Bestimmung zugänglich zu machen. Man spricht hier von einer Funktionalisierungsreaktion und bezeichnet diese Art der Analyse als „**Indirekte polarographische Bestimmung**“. Die beiden Hauptprobleme dieses Verfahrens liegen darin, die Funktionalisierungsreaktion so zu gestalten, daß sie schnell und quantitativ zu einem definierten Produkt führt und daß der Reagenzüberschuß, der wegen seiner Aktivität in den meisten Fällen die Bestimmung des gebildeten Produktes stört, quantitativ entfernt werden kann.

Die zahlreichen bis heute entwickelten Verfahren auf diesem Gebiet lassen sich grob in Oxidationen, Substitutionen und Eliminierungen unterteilen. Eine eigene wichtige Gruppe bilden die vielfältigen Funktionalisierungen an der Carbonylgruppe (Abb. 1).

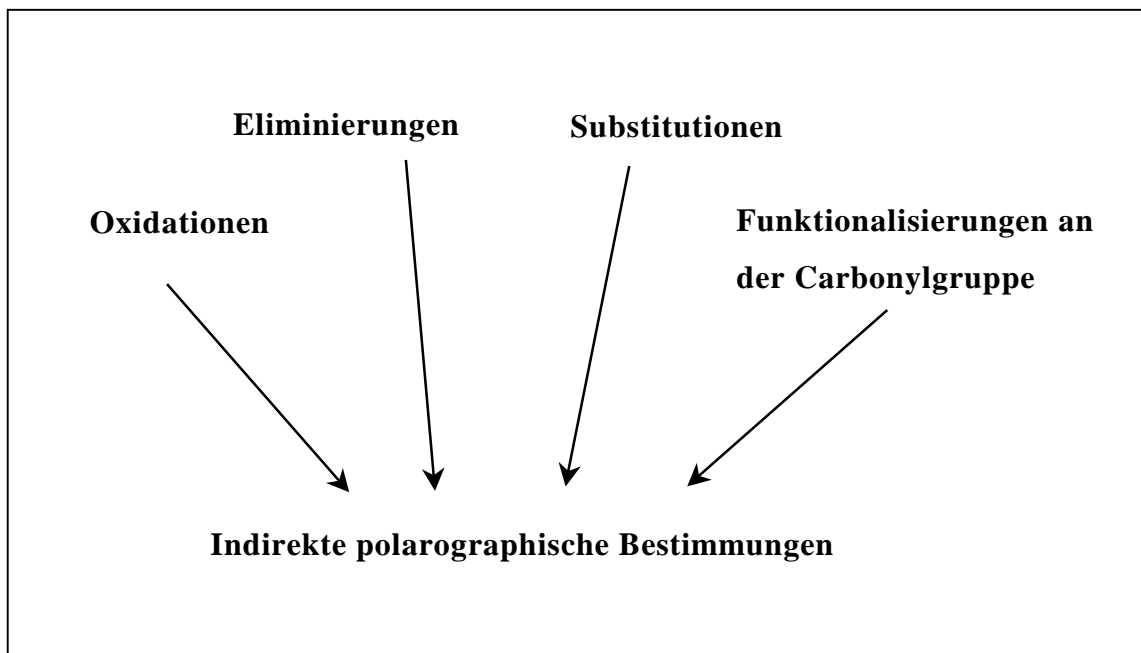
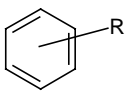
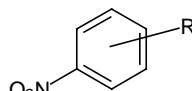
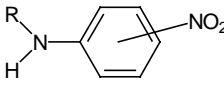
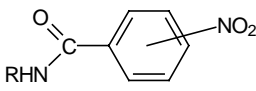


Abb. 1: Möglichkeiten der polarographischen Funktionalisierung

Einen Überblick über die wichtigsten in der Literatur beschriebenen Verfahren gibt Tab. 3.

<b>Funktionelle Gruppe (nicht reduzierbar)</b>	<b>Funktionalisierung durch</b>	<b>erhaltenes aktives Produkt</b>	<b>Beispiele</b>
$\text{R}-\text{CH}_2\text{OH}$ Alkohole, Polyole	Oxidation ( $\text{KMnO}_4$ , $\text{NaIO}_4$ )	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{H}$ Aldehyd	Methanol Glycerol Ethylenglycol
$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\   \\ \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{R}_2 \quad \text{R}_3 \end{array}$ Tertiäre Amine	Oxidation ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	$\begin{array}{c} \text{O} \\   \\ \text{R}_1-\text{N}-\text{R}_3 \\   \\ \text{R}_2 \end{array}$ N-Oxid	Diphenhydramin Lidocain
$\text{R}_1-\text{S}-\text{R}_2$ Sulfide	Oxidation ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	$\begin{array}{c} \text{O} \\   \\ \text{S} \\ / \quad \backslash \end{array}$ Sulfoxid	Chlorpromazin Chlorprothixen Perazin
$\begin{array}{c} \text{OH} (\text{NH}_2) \\   \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$ Hydroxy- bzw. Aminobernsteinsäure	Eliminierung von $\text{H}_2\text{O}$ bzw. $\text{NH}_3$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{COOH} \\ \backslash \quad / \\ \text{C}=\text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{HOOC} \quad \text{H} \end{array}$ Fumarsäure (Malein- säure)	Äpfelsäure Asparaginsäure
$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \backslash \\ \text{C}=\text{O} \\ / \\ (\text{H}) \text{R}_2 \end{array}$ Aldehyde, Ketone	Reaktion mit Hydrazin-Derivaten, prim. Aminen	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \backslash \\ \text{C}=\text{N}-\text{R} \\ / \\ (\text{H}) \text{R}_2 \end{array}$ Hydrazon, Aldimin, Ketimin	Estron Brenztrauben- säure Androsteron
 Aromaten	Nitrierung	 arom. Nitroverb.	Morphin Phenobarbital Phenacetin
$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\   \\ \text{N}-\text{H} \\   \\ \text{R}_2 \end{array}$ Sekundäre Amine	Nitrosierung	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\   \\ \text{N}-\text{N}=\text{O} \\   \\ \text{R}_2 \end{array}$ N-Nitrosamine	Tetracain Ephedrin
$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{N}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$ Phenole, Amine	Substitution (Polynitro- halogenbenzole)	 Nitrobenzylamin, - ether	Thymol Amfetamin
$\text{R}-\text{CH}_2\text{OH}$ $\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{N}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$ Alkohole, Amine	Veresterung bzw. Amidbildung mit Nitrobenzoesäure- derivaten	z.B.  Nitrobenzoesäureamid	Ethanol Cholesterol Piperidin

Tab. 3: Übersicht über indirekte polarographische Bestimmungen

---

---

**Oxidationsreaktionen** gehörten zu den ersten Reaktionen mit der Zielsetzung, inaktive Substanzen so zu derivatisieren, daß sie an der DME reduzierbar werden. In der Regel wird das Oxidationsprodukt wieder zum Ausgangsstoff reduziert.

Alkohole lassen sich gut mit verschiedenen Oxidationsmitteln zum entsprechenden Aldehyd oxidieren. Dieses Verfahren fand bei der Bestimmung von Methanol und Ethanol in Lebensmitteln Anwendung. Als Oxidationsmittel dienten Natriumpersulfat<sup>8</sup>, Kaliumpermanganat und Kaliumdichromat. Der entstehende Form- bzw. Acetaldehyd wurde durch Destillation aus der Vorlage entfernt und bestimmt. Die  $\alpha$ -Hydroxysäuren Milchsäure<sup>9</sup> und Mandelsäure<sup>10</sup> reagieren unter Decarboxylierung zu Acetaldehyd bzw. Benzaldehyd.

Die als Malaprade-Reaktion bekannte Spaltung von Polyhydroxyverbindungen mit Periodat wird auch für die polarographische Bestimmung von Glycerol, Ethylenglycol und Propylenglycol<sup>11</sup> genutzt. Der in stöchiometrischer Menge entstehende Formaldehyd wird an der DME reduziert. Analog läßt sich die Aminosäure Serin umsetzen<sup>12</sup>.

Heusgen<sup>13</sup> beschreibt ein Verfahren zur polarographischen Bestimmung von Estradiol, das auf der Oxidation der OH-Gruppe am C-17 beruht. Der Autor nutzt die 1937 von Oppenauer entdeckte Oxidation von sekundären Alkoholen mit Aceton in Gegenwart von Aluminiumbutylat.

Tertiäre Amine reagieren schnell und quantitativ mit Wasserstoffperoxid zum Aminoxid. Da gerade tertiäre Amine vielfach im Arzneischatz auftreten, z.B. als Neuroleptika, Antihistaminika oder Lokalanästhetika, hat für diese Stoffklasse die indirekte polarographische Bestimmung eine merkliche Bedeutung erlangt. Als Beispiele seien die Bestimmungen von Lidocain, Diphenhydramin und Fomocain genannt<sup>14,15</sup>. Der Überschuß an  $H_2O_2$  wird vor der Messung rasch mit Katalase entfernt.

Analog den N-haltigen Verbindungen ist eine Umsetzung von Thioethern mit Wasserstoffperoxid möglich. Die Reaktion führt in Abhängigkeit vom Analyten und den gewählten Reaktionsbedingungen zum Sulfoxid oder zum Sulfon<sup>16</sup>, die beide elektrochemisch aktiv sind. Auch eine Mischung von Natriumnitrit und Salpetersäure erwies sich als brauchbar. Breit angelegte oxidative Untersuchungen von Oelschläger und seinen Mitarbeitern führten zur Bestimmung von Chlor-

---

---

promazin<sup>17</sup> und weiteren Trizyklen, wie Thioridazin, Perazin, Prothipendyl und Chlorprothixen, deren Gehaltsbestimmung auch in ihren Arzneiformen möglich war<sup>18</sup>. Chlorprothixen ergab bei der Funktionalisierung ein polarographisch aktives Eliminationsprodukt. Kurze Reaktionszeiten (15 min) und gute Wiederfindungsraten (> 97 %) demonstrieren die Brauchbarkeit dieser indirekten polarographischen Methode zur Gehaltsbestimmung der betreffenden Arzneistoffe.

**Eliminierungen** werden nur in wenigen Fällen für die indirekte polarographische Bestimmung genutzt. Durch Wasserabspaltung mit Alkali entstehen z. B. aus Äpfelsäure Fumar- und Maleinsäure<sup>19</sup>, die als Gemisch reduzierbar sind. Die Eliminierung von Ammoniak aus Asparaginsäure mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> führt zu dem gleichen Produktgemisch<sup>20</sup>.

**Carbonylfunktionen** liegen häufig in biogenen Substanzen oder Wirkstoffen vor, sind aber, von einigen Ausnahmen, wie einfachen Aldehyden oder Arylketonen, abgesehen, an der DME im wäßrigen Milieu nicht reduzierbar, weil ihr Halbstufenpotential zu negativ ist.<sup>21</sup> Viele Autoren versuchten deshalb, Carbonylfunktionen zu funktionalisieren, um in den Meßbereich der DME bei einem wäßrigen Katholyten zu kommen. Die meisten Derivatisierungen basieren auf der Ausbildung einer Azomethinstruktur (-C=N-), die zum entsprechenden Amin reduzierbar ist.

17-Ketosteroide, z.B. Androsteron, können durch Umsetzung mit Girards Reagenz T (N-(Hydrazinocarbonylmethyl)-trimethylammoniumchlorid) in eine aktive Form übergeführt werden (Abb. 2). Die Ketogruppe reagiert hier zum Semicarbazon<sup>22</sup>. Auch zur Bestimmung von Estron<sup>23</sup> fand Girards Reagenz T Anwendung. Brenztraubensäure,  $\alpha$ -Ketoglutarensäure und Oxalessigsäure lassen sich mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin leicht in die entsprechenden Hydrazone überführen<sup>24</sup>.

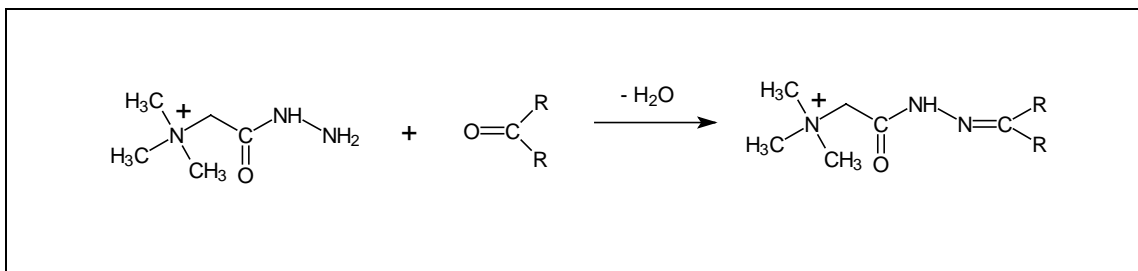


Abb. 2: Derivatisierung von Ketonen mit Girard-Reagenz T

Auch die Bildung von Aldiminen bzw. Ketiminen ist für die Derivatisierung genutzt worden. Deren Aldehyde und Ketone reagieren in neutraler Lösung mit primären Aminen unter Abspaltung von Wasser. Als Beispiel sei die Bestimmung von herzwirksamen Glykosiden genannt, die sich mit Glycin schnell und quantitativ umsetzen lassen<sup>25,26</sup>.

Die Reaktionen von Aldehyden und Ketonen mit Semicarbazid zu Semicarbazonen werden in der Arzneistoffanalytik bevorzugt zu deren Charakterisierung herangezogen, da sie rasch kristallisierende Derivate mit definierten Schmelzpunkten bilden. Aufgrund der C=N Struktur liefern Semicarbazone auch gut auswertbare I-E-Kurven<sup>27</sup>.

Die in der Literatur am häufigsten beschriebenen indirekten polarographischen Bestimmungen beruhen auf vorhergehenden **Substitutionsreaktionen**. In der Mehrzahl der Fälle werden durch S<sub>E</sub>-Reaktionen Nitro- oder Nitrosogruppen in das Molekül eingeführt, die anschließend an der DME reduziert werden können.

Schon im Jahr 1943 benutzte Baggesgaard-Rasmussen die Reaktion von Natriumnitrit mit Morphin zur polarographischen Gehaltsbestimmung<sup>28,29</sup>. Die Nachweisgrenze von 0,1 mg Alkaloid war für damalige Verhältnisse sehr niedrig, dazu kamen eine gute Reproduzierbarkeit und kurze Analysenzeiten. Allerdings erwies sich das von ihm postulierte 2-Nitrosomorphin bei späteren Untersuchungen als 2-Nitroverbindung<sup>30</sup>. Von der großen Anzahl von **Nitrierungen** seien hier nur einige erwähnt. Zu guten Ergebnissen führen zum Beispiel die Nitrierungen von Phenobarbital, Phenytoin und Primidon<sup>31,32</sup>. Phenacetin gibt ein Gemisch von 2- (15%) und 3- Nitrophenacetin (85%), das bei gleichem E<sub>1/2</sub> reduziert wird. Oelschläger und Mitarbeiter konnten 1969 die in der analytischen Dimension

quantitativ verlaufende Derivatisierungsreaktion als sogenannte nitrosierende Nitrierung aufklären<sup>33</sup>.

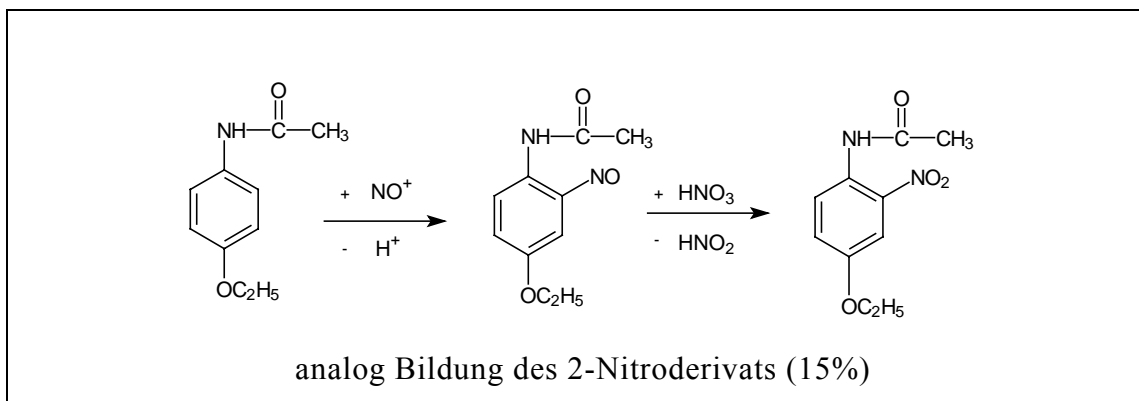


Abb. 3: Mechanismus der Nitrierung am Beispiel von Phenacetin [nach Oelschläger 1969]<sup>33</sup>

Auch zur Bestimmung aromatischer Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan<sup>34</sup> und Phenylalanin<sup>35</sup> eignet sich die C-Nitrierung.

Durch die Reaktion mit  $\text{NO}^+$  können Arzneistoffe mit einer sekundären, aromatischen Aminogruppe in **N-Nitrosamine** übergeführt werden. Die Umsetzung verläuft im sauren Milieu rasch und quantitativ. Auf ihr basieren die Bestimmungen von Lokalanaesthetika, wie Tetracain<sup>36</sup>, und des in der USA und in der Schweiz zugelassenen Antitussivums Benzonat (Tessalon<sup>®</sup>)<sup>37</sup>. Auch Ephedrin kann nach Nitrosierung in pharmazeutischen Formulierungen bestimmt werden<sup>38</sup>.

Verbindungen, die aromatische OH- bzw. Aminogruppen enthalten, reagieren mit Dinitrohalogenbenzolen zu polarographisch aktiven Produkten. Solche Polynitroverbindungen sind aufgrund des hohen Elektronenverbrauches an der DME zur Derivatisierung besonders geeignet. Derartige Bestimmungen sind von Poethke<sup>39</sup>(Phenol) sowie Fürst<sup>40</sup>(Thymol, Carvacrol) beschrieben worden. Der Arbeitsgruppe Oelschläger gelang es, verschiedene Amine, wie Amfetamin und Metamfetamin, mit Pikrylchlorid und Pikrylfluorid quantitativ in Pikrylamine zu überführen, die an der DME unter Verbrauch von 12 Elektronen reduziert werden.<sup>41</sup>

Nitrobenzoylchloride eignen sich zur quantitativen Umsetzung von Alkoholen, Phenolen und Aminen unter Bildung von Nitrobenzoesäureestern bzw. -amiden.



---

---

So versuchte 1968 Fürst die polarographische Aktivität der Dinitrobenzoesäure-ester für die Bestimmung hydroxylhaltiger Verbindungen zu nutzen. Als Modellsubstanzen dienten ihm Ethanol und Cholesterol. Sein Problem bestand in der Abtrennung der bei der vorgelagerten Reaktion zwangsläufig entstehenden 3,5-Dinitrobenzoesäure. Die parallele polarographische Messung von Ester und Säure ohne Abtrennung der letzteren erwies sich als problematisch und gelang nur teilweise durch Variation des Grundelektrolyten. Ein Zusatz von Pyridin führte zur besseren Trennung der polarographischen Stufen.

In ihrer Promotion beschrieb Hehner aus dem Arbeitskreis Oelschläger 1976 die indirekte polarographische Bestimmung kleiner Mengen primärer und sekundärer Amine. Sie setzte Diethylamin, Pyrrolidin, Piperidin, Morpholin sowie  $\beta$ -Phenylethylamin und Amfetamin mit verschiedenen Mono- und Dinitrobenzoesäurechloriden um. Für die Umsetzung im analytischen Maßstab erwies sich ein 30%iger Überschuß des Säurechlorids und ein in Benzol suspendierter Zusatz von  $\text{NaHCO}_3$  als Protonenfänger als günstig. Die Amide entstanden quantitativ und wurden pH-abhängig unter Verbrauch von 4 bis 6 Elektronen reduziert. Im präparativen Maßstab konnten Ausbeuten von 65% bis 90% d. Th. erhalten werden. Mit Hilfe der Kathodenstrahlpolarographie ließen sich die gebildeten Nitroamide noch bis zu einer Konzentration von  $10^{-8}\text{M}$  zu bestimmen<sup>42</sup>.

## 1.2 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid

1985 wurde auf Vorschlag von Oelschläger das 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid (DNBA), für das eine neue zuverlässige Synthese entwickelt worden war, als Reagenz in die Analytik eingeführt und von der Firma Merck (Darmstadt) in den Handel gebracht. Gegenüber dem bis dahin für Derivatisierungen üblichen 3,5-Dinitrobenzoylchlorid weist es eine Reihe von Vorteilen auf. Organische Säurechloride sind bekanntlich relativ instabile Substanzen, die sich schon unter normalen Laborbedingungen leicht zersetzen. Bei Umsetzungen im präparativen Maßstab entstehen größere Mengen aggressiver Säuren, die Metalle angreifen.

Die Instabilität des 3,5-Dinitrobenzoylchlorids war um 1984 Anlaß für die Beschäftigung mit dem Anhydrid der 3,5-Dinitrobenzoesäure, das eine bessere

Stabilität und angenehmere Handhabbarkeit versprach. Die bei den Umsetzungen als Nebenprodukt entstehende 3,5-Dinitrobenzoesäure hat nicht das aggressive Potential der Chlorwasserstoffsäure. Da Anhydride in der Regel eine niedrigere Carbonylaktivität als Säurechloride aufweisen, konnte eine verringerte Reaktivität des Anhydrids vermutet werden. Untersuchungen mit dem Reagenz zeigten jedoch eine hohe Reaktivität bei Veresterungen von Alkoholen und Phenolen<sup>43</sup>.

Reproduzierbar wurde das DNBA erstmals von der Arbeitsgruppe Oelschläger synthetisiert<sup>44</sup>. Das in der Literatur vorher nur dreimal erwähnte Anhydrid (1918, 1926, 1963) konnte nach den dortigen Angaben nicht korrekt dargestellt werden, auch die Angaben über die Schmelzpunkte differierten von 209-226°C<sup>45,46,47</sup>. Die Synthese gelang dann den Autoren Oelschläger und Fritsch über die Bildung der N-Acylpyridiniumverbindung (a). Deren partielle Hydrolyse lieferte rasch das gewünschte Produkt mit einer Rohausbeute von 93% (Abb. 4).

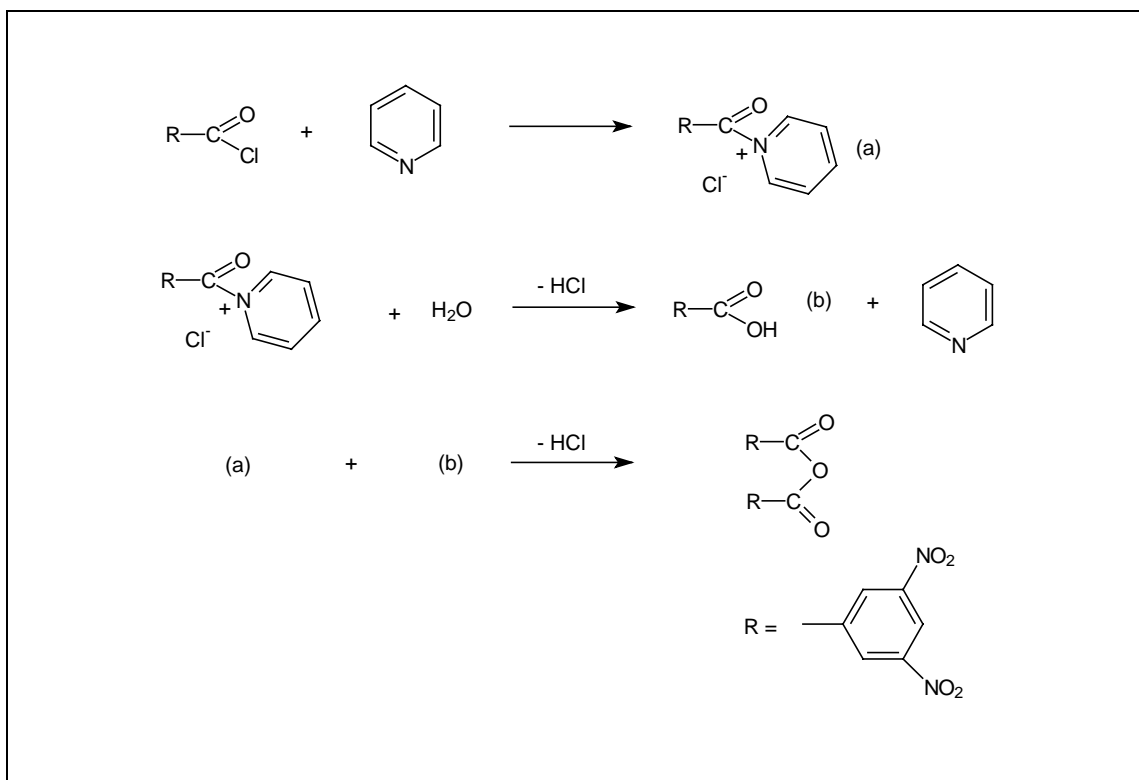


Abb. 4: Synthese von DNBA nach Oelschläger (1984)

Das auf diese Weise synthetisierte DNBA weist nach dem Umkristallisieren aus Toluol einen Schmelzpunkt von 215-217°C auf.

Einen alternativen Syntheseweg zeigt die den Autoren seinerzeit nicht bekannte Arbeit von Palomo-Coll et al.<sup>48</sup> auf. Mit Hilfe des teuren N,N-Bis[2-oxo-3-oxazolidinyl]phosphorsäurediaminchlorid wurde von diesen eine große Anzahl aromatischer Anhydride synthetisiert, u. a. auch 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid. Die Reaktion verläuft glatt mit 90 %iger Ausbeute, wobei das entsprechende Phosphorsäurediamid als Nebenprodukt entsteht (Abb. 5). Als Schmelzpunkt des aus Acetonitril umkristallisierten Anhydrids wurden 220-223°C angegeben. Anhaltspunkte für ein Polymorphiephänomen wurden durch DSC-Untersuchungen nicht gefunden.

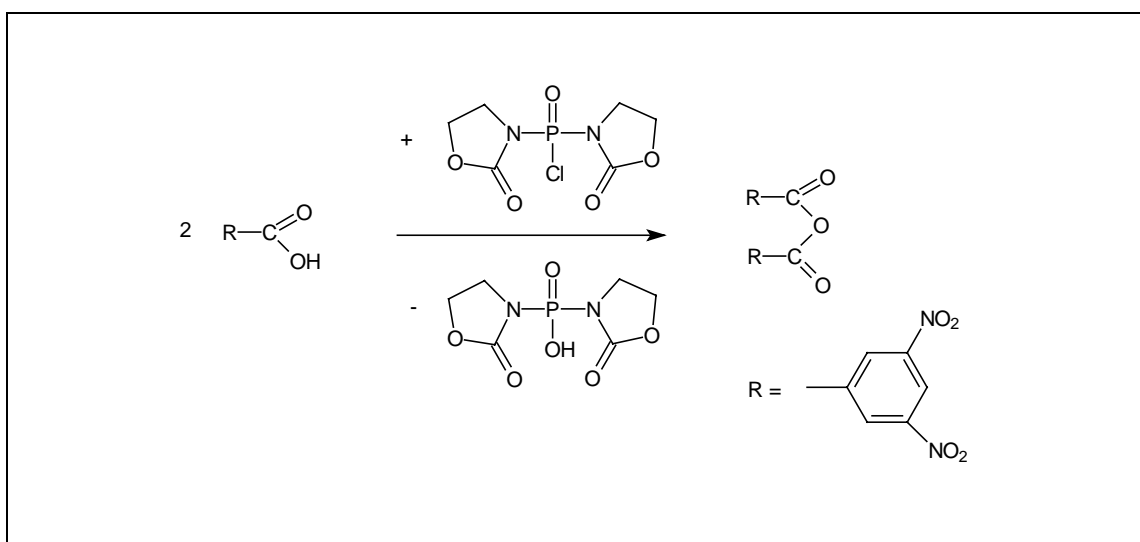


Abb. 5: Synthese von Anhydriden nach Palomo-Coll (1981)<sup>48</sup>

Die Bildung von 3,5-Dinitrobenzoesäureestern ist wegen ihrer charakteristischen Schmelzpunkte eine übliche Methode zur Identifizierung von Alkoholen. Die Veresterung von Alkoholen mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid fand Eingang in die Arzneibücher. Das Europäische Arzneibuch 1997 (Nachtrag 2000) läßt so u. a. die Identitäten von Menthol und Racemischem Menthol bestimmen. Das Deutsche Arzneibuch 1999 läßt Methanol mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid derivatisieren (Schmelzbereich des Esters 105-110°C).

---

---

Nachdem DNBA im Handel verfügbar geworden war, bot es sich wegen seiner vorteilhaften Eigenschaften als Ersatz für das Säurechlorid an. 1986 fand es Eingang in den Deutschen Arzneimittel-Codex (DAC) und wurde zur Identifizierung von 1-Propanol herangezogen. In der Literatur sind weitere, auf diese Weise erhaltene 3,5-Dinitrobenzoesäureester beschrieben<sup>43</sup>.

## 2 Problemstellung

Primäre und sekundäre Aminogruppen sind häufig die hydrophile Gruppe in Arzneistoffen. Vor allem Arzneistoffe, die im Zentralnervensystem oder im peripheren Nervensystem angreifen, enthalten Aminogruppen. Eine Auswahl wichtiger Wirkstoffe mit primären oder sekundären Aminogruppen ist, geordnet nach Indikationen, in Tab. 4 aufgeführt.

<b>Wirkstoffgruppe</b>	<b>Beispiele</b>
Psychopharmaka	Desipramin, Maprotilin, Fluoxetin, Tranylcypromin, Oxitriptan, Chlordiazepoxid
Lokalanaesthetika	Procain, Tetracain, Prilocain, Articain
Muskelrelaxantien	Baclofen, Memantin
Antiparkinsonmittel	Levodopa, Benserazid, Carbidopa
$\alpha$ -Sympathomimetika	Oxedrin, Phenylephrin, Tramazolin
$\beta$ -Sympathomimetika	Salbutamol, Terbutalin, Fenoterol
Sympatholytika	Prazosin, Doxazosin, Terazosin
$\beta$ -Blocker	alle $\beta$ -Blocker
H <sub>1</sub> -Antihistaminika	Astemizol
Antifibrinolytika	p-Aminomethylbenzoesäure, Tranexamsäure
Koronartherapeutika	Tocainid, Procainamid, Mexiletin, Propafenon
ACE-Hemmer	Enalapril, Lisinopril
Expektorantien	Bromhexin, Ambroxol
Prokinetika	Metoclopramid, Bromoprid, Cisaprid
Diuretika	Thiazide, Furosemid, Triamteren
Antiprotozoika	Chloroquin, Mefloquin, Primaquin

Tab. 4: Arzneistoffe mit primären bzw. sekundären Aminogruppen (Auswahl)

---

---

Weiterhin können sekundäre bzw. primäre Amine bei der Biotransformation entstehen. So ergibt zum Beispiel Amitriptylin durch oxidative Desaminierung Nortriptylin, das bei der Erstellung von Konzentrations-Zeit-Diagrammen, also Plasmaspiegeln, erfaßt werden muß.

Die Analytik von primären und sekundären Aminen ist mithin von großer Bedeutung für die Pharmazie und Medizin, vor allem zur schnellen Bestimmung geringer Konzentrationen in biologischen Medien. Neben der Gaschromatographie und der HPLC hat die Polarographie auf diesem Sektor eine Einsatzmöglichkeit. Eine direkte polarographische Messung von Aminen an der DME durch Reduktion entfällt in der Regel. In Ausnahmefällen gelingt eine Oxidation von Arzneistoffen mit primären aromatischen Aminogruppen mittels rotierender Scheibenelektrode (glassy carbon electrode)<sup>49</sup>. So lassen sich Benzocain, Procain und Sulfonamide bis in den Bereich von  $10^{-6}$  M bestimmen. Somit lag angesichts der Ausgangssituation der Gedanke nahe, charakteristische Vertreter von polarographisch inaktiven Arzneistoffgruppen mit DNBA im analytischen Maßstab zu derivatisieren und anschließend die resultierenden Nitroderivate an der DME zu vermessen.

Es muß betont werden, daß primäre und sekundäre Amine bisher nicht mit DNBA unter arzneibuchanalytischen Aspekten umgesetzt worden sind und daher das polarographische Verhalten solcher Arzneistoffderivate unbekannt war. Außerdem existierte die reizvolle Aufgabe, nach Möglichkeit eine verbesserte oder neue Synthese für das o. a. Reagenz zu entwickeln und im Hinblick auf seine Bedeutung als handelsübliches Reagenz die Stabilität bei Lagerung unter Normalbedingungen zu untersuchen.

### **3 Ergebnisse und deren Diskussion**

#### **3.1 Untersuchungen zum Reagenz**

##### **3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid**

###### **3.1.1 Synthesen von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid**

Neben den beiden vorstehend beschriebenen Synthesen für DNBA wird für die Darstellung von aromatischen Carbonsäureanhydriden die Carbodiimid-Methode empfohlen<sup>50,51,52</sup>. Es stellte sich daher die Frage, warum diese einfache Synthese noch nicht zur Darstellung von DNBA Anwendung gefunden hat. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (a) wurde ursprünglich zur Synthese von Carbonsäureestern<sup>53,54</sup> entwickelt und später auch in der Peptidsynthese eingesetzt (Methode nach Sheehan). Die Reaktion verläuft über den intermediär auftretenden und sehr reaktiven O-Acylisoharnstoff (b)<sup>55</sup>. Die als Nebenprodukt auftretenden Säureanhydride werden zum Hauptprodukt, wenn man ohne Alkohol arbeitet. Neben dem zwangsläufig anfallenden symmetrischen Dicyclohexylharnstoff (c) entsteht in einer Nebenreaktion ein N-Acyl-Harnstoff-Derivat (d) (Abb. 6).

Es wurde gefunden, daß sich DCC auch für die Darstellung von DNBA erfolgreich einsetzen läßt. Allerdings traten bei der Synthese Schwierigkeiten auf, da sich sowohl die 3,5-Dinitrobenzoesäure als auch deren Anhydrid in den für die Reaktion üblichen Lösungsmitteln (Chloroform, Toluol) nicht oder nur in geringem Umfang lösen. Erfolgreich verlief sie dagegen in Acetonitril bei Raumtemperatur (RT). Nach Digerieren mit Methanol und Umkristallisieren aus Acetonitril erhält man das reine Anhydrid vom Schmelzpunkt 220-223°C in einer Ausbeute von 76% d. Th.. Neben dem symmetrischen Dicyclohexylharnstoff (Schmp. 230–232°C) wurde auch der N-Acyl-Harnstoff isoliert und charakterisiert (Schmp. 170-171°C).

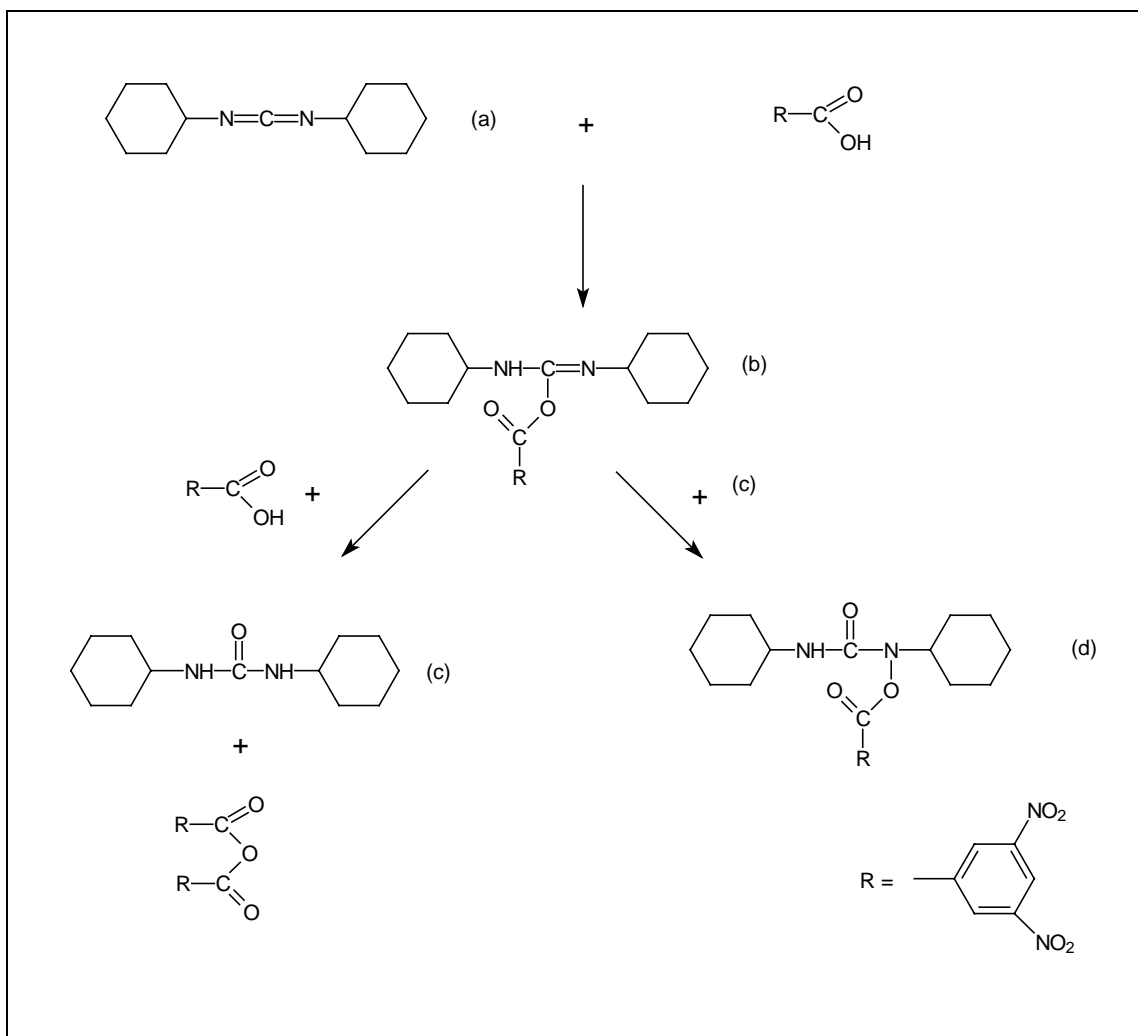


Abb. 6: Synthese von DNBA mit DCC

Ein Vergleich der auf diese Weise möglichen drei Synthesewege zeigt, daß alle relativ schnell und mit hohen Ausbeuten zum Ziel führen.

Synthese nach	Ausbeute [% d. Th.]	Schmelzpunkt [°C]
Oelschläger	93	215-217
Palomo-Coll	90	220-223
DCC-Methode	76	220-223

Tab. 5: Synthesen von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid

Die Synthese mit N,N-Bis[2-oxo-3-oxazolidinyl]phosphor-diamidchlorid ist vergleichsweise teuer. Daher wurde in dieser Arbeit der Synthese nach



---

---

Oelschläger/Fritsch<sup>44</sup> der Vorzug gegeben, weil sie wegen des Einsatzes von 3,5-Dinitrobenzoylchlorid und Pyridin die kostengünstigste ist.

### **3.1.2 Gehaltsbestimmung von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid**

Eine Gehaltsbestimmung des DNBA war bisher nicht bekannt. Sie kann auf indirektem Weg durch Umsetzung mit Piperidin und nachfolgender Bestimmung des entstandenen Amids durch HPLC (Abb. 7) erfolgen. Mit einem großem Überschuß von Piperidin (ca. 300%) gelang ein quantitativer Umsatz des Säureanhydrids, wobei als Acylierungskatalysator Pyridin zugesetzt wurde. Eine Kalibriergerade von 3,5-Dinitrobenzoylpiperidin wurde aufgestellt, als innerer Standard diente 4-Dimethylaminobenzaldehyd.

Für das nach einmaligem Umkristallisieren aus Acetonitril erhaltene Produkt vom Schmelzpunkt 220-223°C ergab sich ein mittlerer Gehalt (n=3) von 99,8 %.

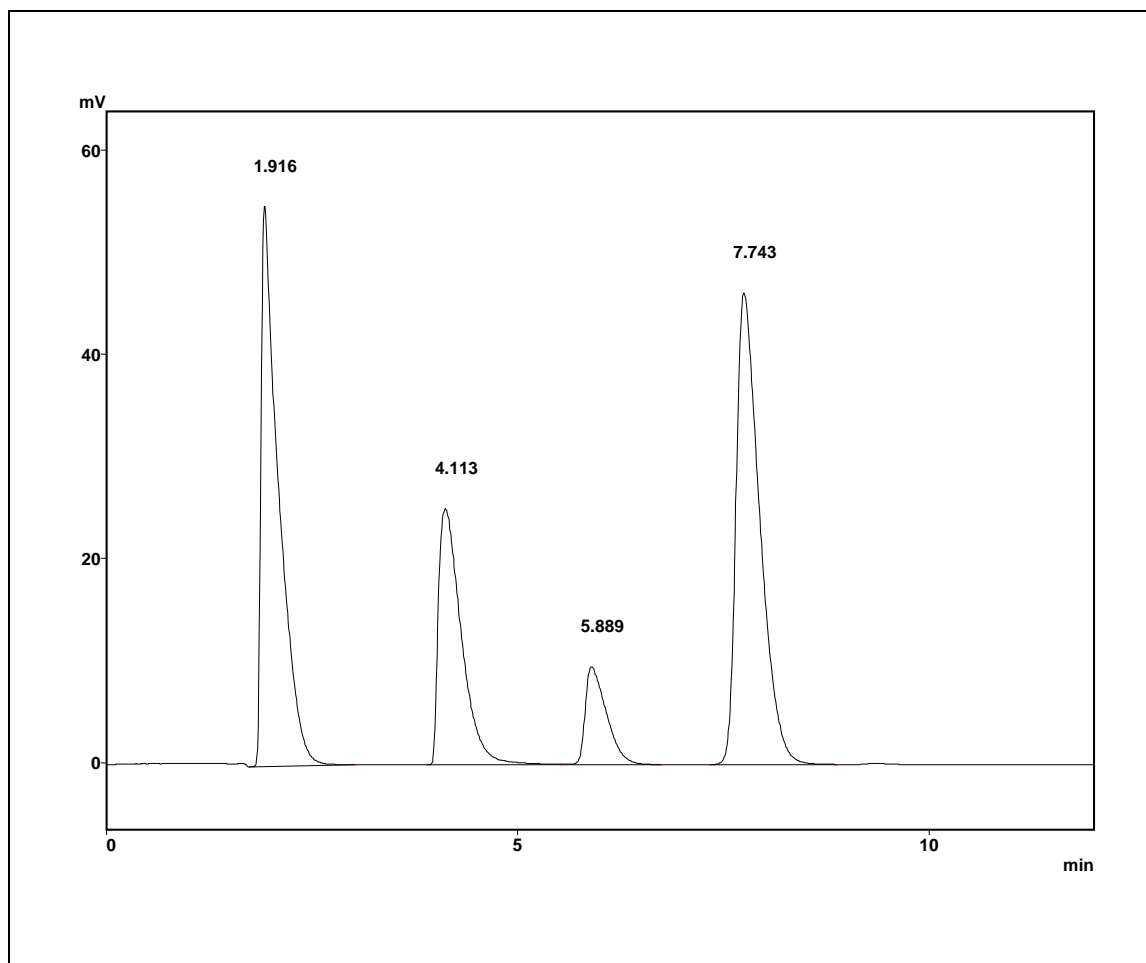


Abb. 7: Chromatogramm der Gehaltsbestimmung von DNBA mittels Piperidin

( $t_r$ : 3,5-Dinitrobenzoesäure 1,9 min; Pyridin 4,1 min; Dimethylaminobenzaldehyd = innerer Standard 5,9 min; 3,5-Dinitrobenzoylpiperidin 7,7 min)

### 3.1.3 Stabilität von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid

Im Vergleich mit dem Säurechlorid erwies sich DNBA erwartungsgemäß als viel stabiler gegen hydrolytische Einflüsse. Während 3,5-Dinitrobenzoylchlorid sehr schnell unter normalen Laborbedingungen in 3,5-Dinitrobenzoesäure und Salzsäure zerfällt, erwies sich das Anhydrid äußerlich unverändert. Um die Stabilität näher zu untersuchen, wurden unter definierten Bedingungen (37°C, Luftfeuchtigkeit 82%) in einem offenem Weithalsgefäß Proben von Säurechlorid und Anhydrid gelagert und deren Gehalt über einen Zeitraum von 14 Tagen mit dem oben beschriebenen HPLC-Verfahren bestimmt. Abb. 8 zeigt den Zerfall über einen

Zeitraum von 14 Tagen. Deutlich ersichtlich ist die schnelle Gehaltsabnahme von 3,5-Dinitrobenzoylchlorid, dessen Gehalt schon nach einem Tag auf 10 % gesunken ist (DNBA 94%). Das Anhydrid besitzt dagegen nach 14-tägiger Lagerung unter diesen Bedingungen noch einen Gehalt von 55%.

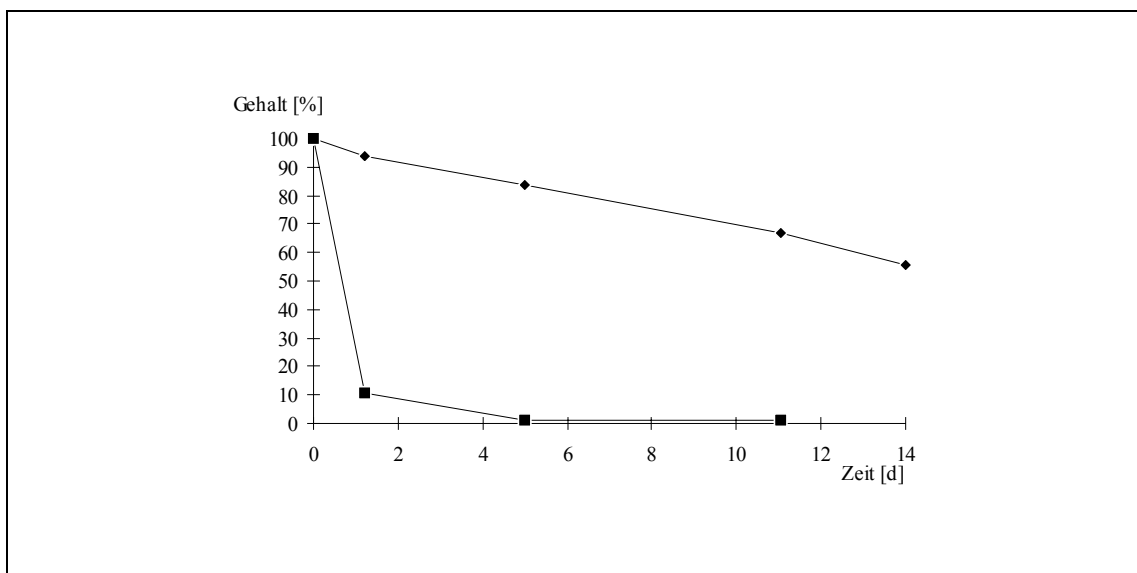


Abb. 8: Zerfall von DNBA (-♦-) und 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (-■-) bei Lagerung (37°C und Luftfeuchtigkeit 82%)

Im Widerspruch zu älteren Literaturangaben<sup>44</sup> erwies sich DNBA als kaum hygroskopisch. So nahm eine Probe in 30 Tagen (unter Standardbedingungen gelagert bei RT, Luftfeuchtigkeit 90% ±3 %) nur 0,13% Wasser auf und war äußerlich unverändert.

Trotz der gegenüber 3,5-Dinitrobenzoylchlorid vergleichsweise hohen Stabilität und geringen Hygroskopizität muß DNBA luftdicht verschlossen aufbewahrt werden. Ein mehrere Jahre gelagertes DNBA des Handels (Merck, Darmstadt) zeigte einen Gehalt von 81% (n=3).

Für die Umsetzungen mit den Testsubstanzen (Tab. 6) wurde eine  $5 \cdot 10^{-3}$  M Lösung von DNBA in Acetonitril verwendet. Der Wassergehalt des Lösungsmittels, durch Karl-Fischer-Titration bestimmt, betrug 0,011%. Für die geplanten Untersuchungen war es nun eine wichtige Frage, wie lange sich diese Lösung hält. Nach sechs Tagen wurden noch ca. 99 % des Anfangsgehaltes ermittelt. Somit war diese Reagenzlösung für die Prüfungen geeignet. Eine analoge Lösung von

---

---

3,5-Dinitrobenzoylchlorid fällt im gleichen Zeitraum auf einen Gehalt von 81 % ab.

## **3.2 Untersuchungen zur Umsetzung von Aminen**

### **3.2.1 Qualitative Umsetzung der Modellsubstanzen**

Um die Eignung von DNBA als Derivatisierungsreagenz zu untersuchen, wurden einige Substanzen zunächst nur unter qualitativen Aspekten umgesetzt. Ferner wurde unter DC-Kontrolle geprüft, ob die Amidbildung ohne Nebenreaktionen abläuft. Als Protonenfänger fungierte Pyridin. Die erhaltenen Amide dienten nach eindeutiger Charakterisierung durch IR- und Massenspektroskopie als Referenzsubstanzen für weitere Untersuchungen.

Die Auswahl der Modellsubstanzen erfolgte nach verschiedenen Kriterien. Es wurden einerseits Substanzen gewählt, die sich in mehreren Arzneiformen, z. B. als Tabletten und Ampullen, im Handel befinden (Tab. 6). Mit Ausnahme von Fenfluramin, das in Italien und der Schweiz gehandelt wird, sind alle Arzneistoffe in der Bundesrepublik Deutschland zugelassen. Wichtiger war, daß sich diese Arzneistoffe in der Struktur merklich unterschieden, um die Breite der Anwendbarkeit der analytischen Reaktion testen zu können. Daher wurden sowohl primäre und sekundäre, aliphatische und aromatische Amine als auch Säurehydrazide getestet.

Die untersuchten Arzneistoffe decken mehrere Indikationsgebiete ab. Sie dienen als Antiarrhythmika (Mexiletin, Procainamid), Antidepressiva (Desipramin, Maprotilin), Lokalanaesthetika (Prilocain), Anorektika (Fenfluramin), Tuberkulostatika (Isoniazid) und Muskelrelaxantien (Baclofen).

INN	IUPAC-Name	Handelsnamen (Arzneiformen, Auswahl)	Art des Amins	Amid- bildung ja/nein
Mexiletin	1-Methyl-2-(2,6-xyloxy)ethylamin	Mexitil <sup>®</sup> (KAP, AMP, REK)	primär aliphatisch	ja
Baclofen	4-Amino-3-(4-chlorphenyl)-buttersäure	Lioresal <sup>®</sup> (TAB, AMP) Baclofen-rat. <sup>®</sup> (TAB)	primär aliphatisch	ja
Desipramin	3-(10,11-Dihydro-5H-dibenz[b,f]azepin-5-yl)-N-methylpropylamin	Pertofran <sup>®</sup> (DRA) Petylyl <sup>®</sup> (DRA)	sekundär aliphatisch	ja
Prilocain	N-[(2-Methylphenyl)-2-propylamino]-propanamid	Emla <sup>®</sup> (CRE, PFL) Xylonest <sup>®</sup> (AMP)	sekundär aliphatisch	ja
Maprotilin	N-Methyl-3-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-9-yl)propylamin	Aneural <sup>®</sup> (FTA) Ludiomil <sup>®</sup> (FTA, AMP) Mirpan <sup>®</sup> (FTA)	sekundär aliphatisch	ja
Fenfluramin	N-Ethyl- $\alpha$ -methyl-3-(trifluormethyl)-phenethylamin	Adipomin <sup>®</sup> (TAB) Ponderal <sup>®</sup> (TAB, REK)	sekundär aliphatisch	ja
Diclofenac-Na	[2-(2,6-Dichloranilino)phenyl]essigsäure	Diclac <sup>®</sup> (AMP, SUP) Voltaren <sup>®</sup> (DRA, GEL)	sekundär aliphatisch	nein
Metoclopramid	4-Amino-5-chlor-N-(2-diethylaminoethyl)-2-methoxybenzamid	Cerucal <sup>®</sup> (TRO, REK) Gastrosil <sup>®</sup> (SUP, AMP) Paspertin <sup>®</sup> (TRO, FTA)	primär aromatisch	ja
Procainamid	4-Amino-N-[(2-(diethylamino)ethyl)]-benzamid	Neypulpin <sup>®</sup> (AMP) Procainamid Duriles <sup>®</sup> (RET)	primär aromatisch	ja
Isoniazid	4-Pyridincarbonsäurehydrazid	Myambutol <sup>®</sup> (AMP) Isozid <sup>®</sup> (FTA, TAB)	Hydrazid	ja

Tab. 6: Ausgewählte Arzneistoffe für die Reaktion mit 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid

(AMP=Ampullen, CRE=Creme, DRA=Dragee, FTA=Filmtabletten, GEL=Gel, KAP=Kapseln, KMR=Kapseln magensaftresistent, PFL=Pflaster, REK=Retardkapseln, SUP=Suppositorien, TAB=Tabletten, TRO=Tropfen)

Die letzte Spalte der Tab. 6 weist aus, daß sich mit Ausnahme von Diclofenac-Natrium alle geprüften Arzneistoffe mit DNBA ohne Nebenreaktionen erfolgreich umsetzen lassen. Allerdings erwies sich DNBA aufgrund seiner schlechten Löslichkeit (Dioxan 9 mg/ml, Acetonitril 3 mg/ml, Dichlormethan praktisch unlöslich) für größere Umsetzungen als schlechter geeignet. Die Ausbeuten lagen nach Reinigungsschritten im allgemeinen bei ca. 70%.

Der negative Befund bei Diclofenac-Natrium basiert auf einer raschen, nahezu quantitativ verlaufenden Cyclisierung der Substanz bei Anwesenheit von DNBA und Pyridin. Dabei bildet sich das Lactam, auf das auch in der Reinheitsprüfung des EUAB geprüft wird. Möglicherweise verläuft die Reaktion über ein gemischtes Anhydrid. Die Struktur wurde durch NMR-, MS- und IR-Spektroskopie gesichert. Der Befund ist insofern bemerkenswert, weil Zajac et al. etwa zur gleichen Zeit eine saure Katalyse der Cyclisierung beobachtet haben<sup>56</sup>.

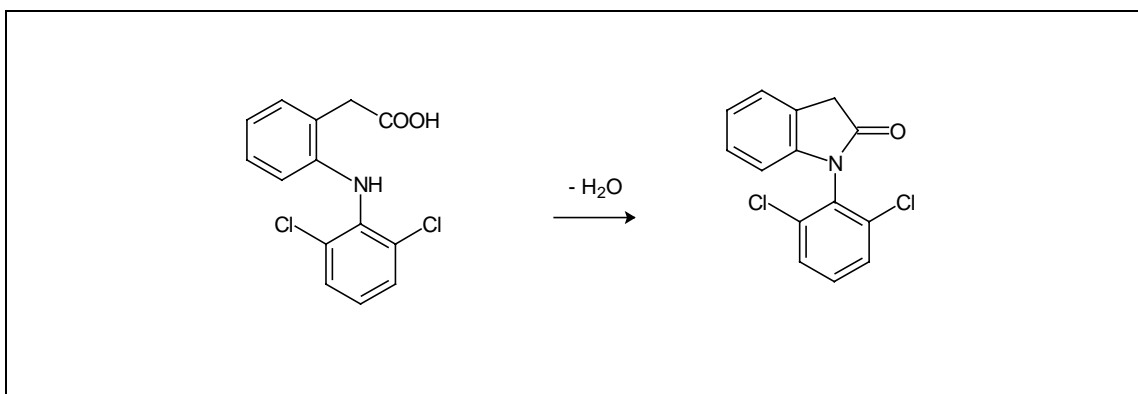


Abb. 9: Cyclisierung von Diclofenac

Durch HPLC wurde nachgewiesen, daß die Geschwindigkeit der Lactambildung durch einen Zusatz von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) noch wesentlich erhöht werden kann.

Außer dem Nebenprodukt 3,5-Dinitrobenzoesäure vom Schmp. 205-207°C fielen bei allen Umsetzungen der in Tab. 6 aufgeführten Arzneistoffe mit DNBA die angestrebten Amide kristallin an. Die Schmelzpunkte liegen zwischen 30°C und 287°C. Da die unter 100°C schmelzenden Amide nur langsam kristallisieren, sind ihre Schmelzpunkte für eine physikalische Charakterisierung nicht akzeptabel,

während sich die Schmelzpunkte der höher schmelzenden Amide vorzüglich eignen (Tab. 7).

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

Tab. 7: Schmelzpunkte der 3,5-Dinitrobenzoesäureamide einiger Arzneistoffe

### 3.2.2 Quantitative Umsetzung im analytischen Maßstab

Indirekte polarographische Bestimmungen setzen in der vorgelagerten chemischen Reaktion im optimalen Fall einen quantitativen, zumindestens aber einen reproduzierbaren Umsatz des Analyten voraus. Ich strebte einen quantitativen Umsatz der Analyten an, der unter Berücksichtigung der Meßgenauigkeit praktisch bei >99% erreicht sein sollte. Das entstehende polarographisch aktive Produkt sollte einheitlich sein. Weiterhin wurde ein schneller Umsatz gefordert, um den Zeitaufwand für die Analyse gering zu halten. Die Umsetzung sollte im Mikromaßstab möglich sein. Angestrebt wurde daher ein quantitativer Umsatz einer 10<sup>-4</sup> M Lösung, so daß bei der Validierung noch 1%, entsprechend einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M, erfaßbar war.

Die Amidierungen wurden in Acetonitril durchgeführt, das sowohl die Edukte als auch die Produkte gut löst.

Die Umsetzung eines Amins mit DNBA verläuft wegen des Fehlens eines reaktiven nucleophilen Protonenakzeptors bei Raumtemperatur erwartungsgemäß sehr langsam. Ein zeitlich zu vertretender quantitativer Umsatz war daher nicht zu erwarten. Am Beispiel des primären aromatischen Amins Procainamid konnte aber gezeigt werden, daß sich bei Siedetemperatur (82°C, Analytkonzentration ab  $10^{-3}$  M) analytisch akzeptable Reaktionszeiten ergeben (Tab. 8). Allerdings war ein 5-facher Überschuß an DNBA erforderlich.

<b>DNBA-Konzentration [mol/l]</b>	<b>Reaktionszeit für einen &gt; 99 %igen Umsatz [min]</b>
$2 \cdot 10^{-3}$	21,0
$3 \cdot 10^{-3}$	7,6
$5 \cdot 10^{-3}$	6,5

Tab. 8: Reaktionsdauer für einen Umsatz > 99% von Procainamid (ohne Basenzusatz, Analytkonzentration  $10^{-3}$  M)

Weiterhin ergaben die Untersuchungen Proportionalität zwischen der Reaktionszeit und dem Logarithmus des Quotienten der Konzentrationen von Procainamid und DNBA. Das deutet auf einen Reaktionstyp 2. Ordnung hin. Die Geschwindigkeitskonstante wurde aus der graphischen Auftragung mit 2,01 l/mol min ( $s_{\text{rel}} = 6,8\%$ ) bestimmt.

Für eine quantitative Umsetzung von Carbonsäureanhydriden mit primären und sekundären Aminen müssen die bei der Reaktion freiwerdenden Protonen abgefangen werden. Prinzipiell kann das durch Zusatz von verdünnter Natronlauge erfolgen (Schotten-Baumann-Reaktion). Allerdings tritt dabei eine Hydrolyse des sehr reaktiven Anhydrids in größerem Umfang ein. Bei der sogenannten Einhorn-Variante wird Pyridin zugesetzt, das den Verlauf der Reaktion wesentlich fördert.



Das Pyridin fungiert nicht nur als Protonenakzeptor, sondern auch als Acylierungskatalysator.

Der Pyridinzusatz beschleunigt die Reaktion so stark, daß bei Raumtemperatur (25°C) gearbeitet werden kann, wodurch sich der apparative Aufwand merklich verringern ließ. Analytisch vertretbare Zeiten ergaben sich schon bei  $10^{-4}$  M Lösungen der umzusetzenden Amine und einem DNBA-Überschuß von 100 %. Tab. 9 zeigt, daß auch die Pyridinkonzentration einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat.

Erwartungsgemäß reagieren die stärker nucleophilen sekundären Amine etwas schneller als primäre Amine (Beispiel Desipramin und Mexiletin).

<b>Pyridin [<math>10^{-4}</math> mol/l]</b>	<b>Umsatz 99 % [min] primäres Amin (Mexiletin-HCl)</b>	<b>Umsatz 99 % [min] sekundäres Amin (Desipramin-HCl)</b>
3	> 40	35
6	15	14
12	13	10

Tab. 9: Geschwindigkeit der Acylierung von Mexiletin-HCl ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) und Desipramin-HCl ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) mit DNBA ( $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l) bei 25 °C in Abhängigkeit von der Pyridinkonzentration. Der Umsatz wurde durch HPLC bestimmt.

1967 führten Litvinenko und Kirichenko 4-Dialkylaminopyridine als hochwirksame Acylierungskatalysatoren in die organische Synthese ein<sup>57</sup>. Vor allem 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) fand große Verbreitung. So erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Benzoylierung von m-Chloranilin bei Ersatz von Pyridin durch DMAP um das 6000-fache. Diese Aktivitätssteigerung beruht nicht allein auf der gegenüber Pyridin höheren Basizität der 4-Alkylaminopyridine ( $pK_a$  [DMAP]=9,70,  $pK_a$  [Pyridin]=5,29). Ein Zusatz von Triethylamin ( $pK_a$ =10,65) erwies sich so nicht als wesentlich wirksamer als Pyridin<sup>58</sup>. Als Ursache kann vielmehr die Bildung von intermediären N-Acyl-4-dialkylaminopyridiniumsalzen angesehen werden, deren Präsenz in aprotischen Lösungsmitteln in den 80er

Jahren durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bewiesen worden ist<sup>58</sup>. Die Gleichgewichtslage dieser Reaktion ist durch die Mesomeriestabilisierung zugunsten der N-Acylverbindung verschoben (Abb. 10). Pyridin bildet dagegen in aprotischen Lösungsmitteln keine oder zumindestens nur sehr geringe Mengen von N-Acylpyridiniumsalzen. Die Überlegung, 4-Dialkylaminopyridine anstelle von Pyridin für die Funktionalisierung von Aminen mit DNBA zu verwenden, lag also nahe.

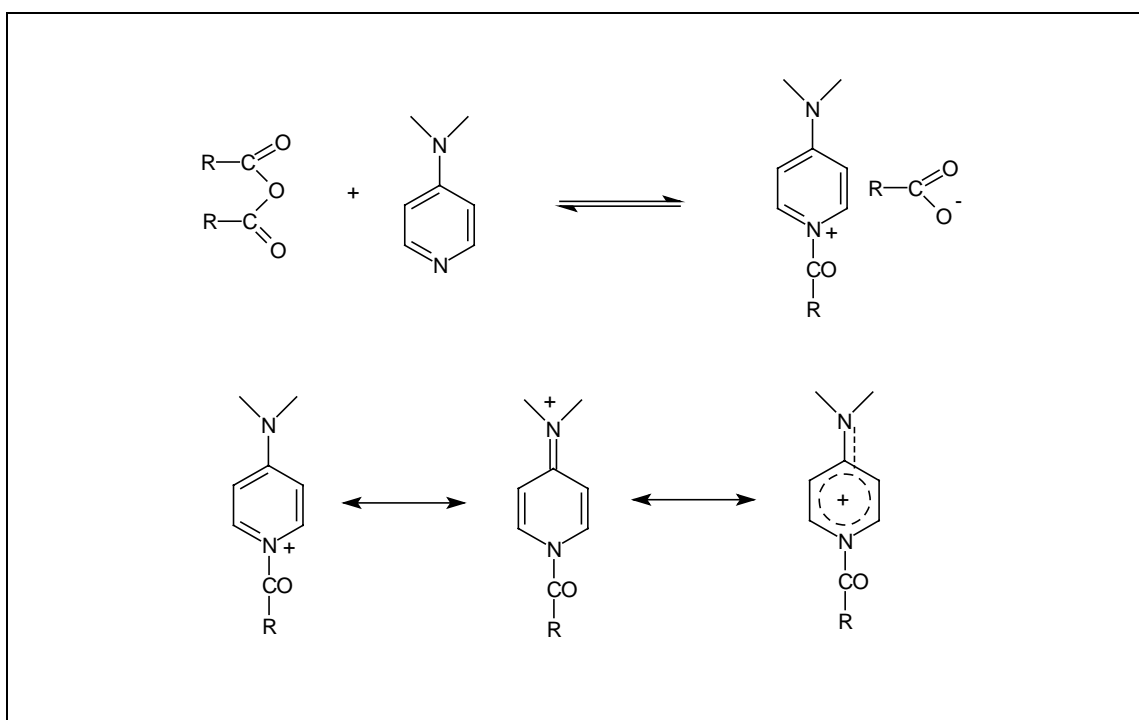


Abb. 10: Reaktion von Anhydriden mit DMAP<sup>57</sup>

Erwartungsgemäß bewährte sich DMAP auch bei der Amidbildung mit DNBA. Die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit ist in der Tat enorm. Tab. 10 zeigt dies am Beispiel der Umsetzung mit Mexiletin. Bereits in der ersten Minute wird bei Raumtemperatur fast die gesamte Menge an Analyt acyliert. Nach etwa 4 Minuten ist überhaupt kein Edukt mehr nachweisbar (HPLC). Vergleichbare Ergebnisse werden mit 4-Pyrrolidinyllpyridin erzielt.

---

---

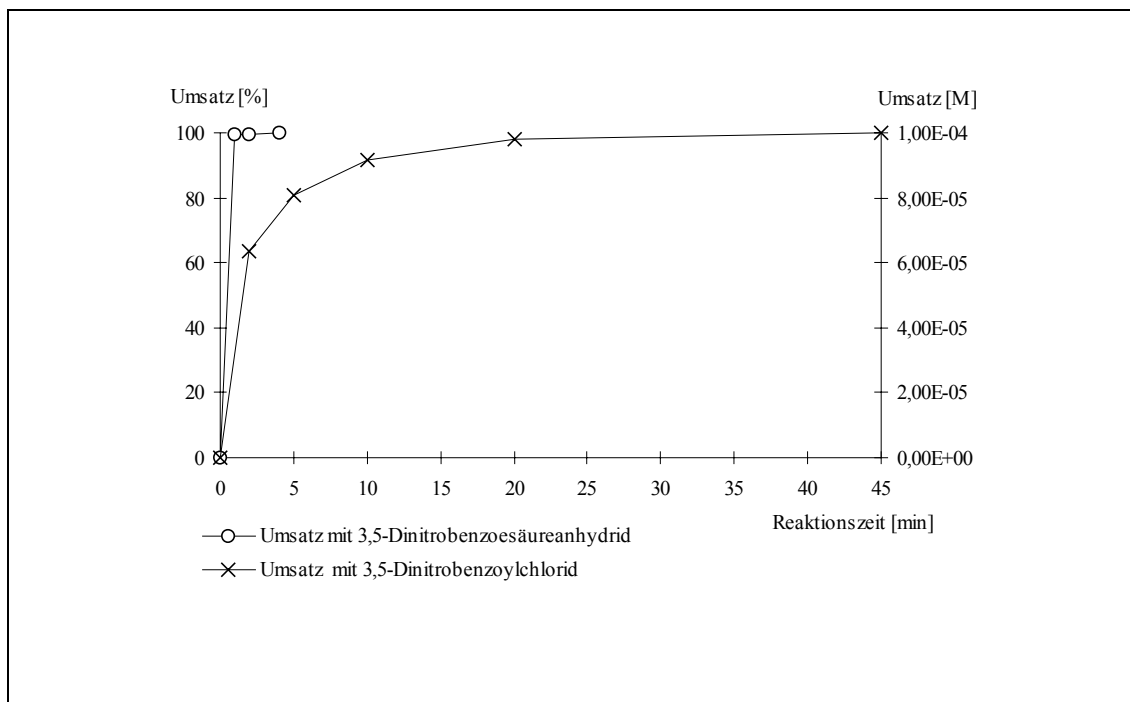
Reaktionszeit [min]	Umsatz Mexiletin-HCl [%]
0	0
1	99,4
2	99,7
4	~100

Tab. 10: Geschwindigkeit der Acylierung von Mexiletin-HCl ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) mit DNBA ( $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l), Pyridin ( $3 \cdot 10^{-4}$  mol/l) und DMAP ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) bei 25 °C. Der Umsatz wurde durch HPLC bestimmt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Konzentration an DMAP. Ein dem Amin äquimolarer Zusatz des Acylierungskatalysators ist im allgemeinen ausreichend, als zusätzliche Base wird Pyridin zugesetzt. Außer den bei der Reaktion freigesetzten Protonen muß bei der Bemessung der Pyridinmenge auch das Proton der als Salze eingesetzten Analyte berücksichtigt werden.

Die Reaktion erfüllt bezüglich Geschwindigkeit und Umsatz alle Anforderungen für eine Funktionalisierung. Da zudem bei Raumtemperatur gearbeitet wird, ist der apparative Aufwand denkbar gering.

Ersetzt man DNBA durch das entsprechende Säurechlorid, so verläuft bei gleicher Konzentration von DMAP und Pyridin die Acylierung wesentlich langsamer (vgl. Abb. 11). Dieses Ergebnis überrascht im Hinblick auf die größere Carbonylaktivität der Säurechloride.



**Abb. 11:** Umsetzung von Mexiletin-HCl ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) mit DNBA bzw. 3,5-Dinitrobenzoylchlorid ( $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l) bei 25 °C mit Zusatz von Pyridin ( $4 \cdot 10^{-4}$  mol/l) und DMAP ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l). Der Umsatz wurde durch HPLC bestimmt.

Abb. 11 veranschaulicht, daß die vollständige Acylierung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid ungefähr 20 mal langsamer verläuft als mit dem Säureanhydrid. Höfle machte bei der Umsetzung von 1-Ethynylcyclohexanol, ähnliche Erfahrungen<sup>58</sup>. Die Ursache dürfte darin liegen, daß das, bei den Umsetzungen über die intermediär als Ionenpaare vorliegenden N-Acylpyridiniumsalze, in räumlicher Nähe präsenste Carboxylatanion das freiwerdende Proton übernimmt.

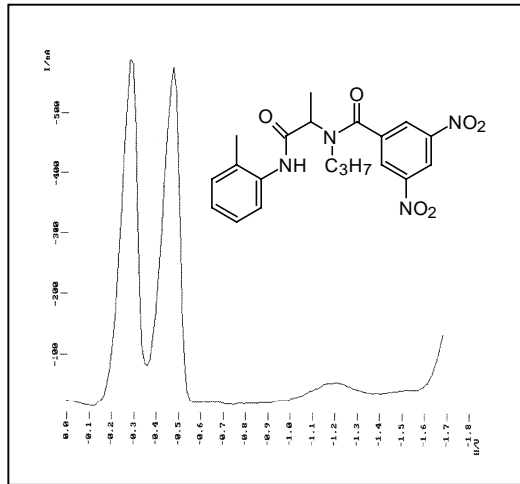
### 3.3 Polarographische Untersuchungen

#### 3.3.1 Vergleich der Polarogramme ( $DC_T$ , DPP)

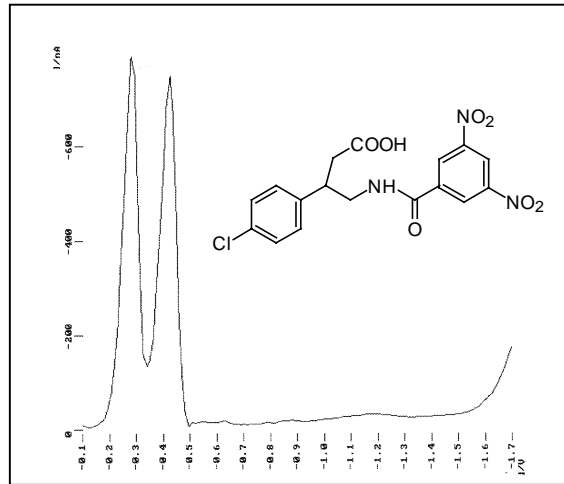
Die nachfolgenden Kapitel beinhalten die elektrochemischen Untersuchungen der 3,5-Dinitrobenzoyl-Derivate (DNB-Derivate). Als Voraussetzung für eine Gehaltsbestimmung gemäß der Ilković-Gleichung mußten zunächst die Stabilität der Derivate sowie deren Nachweis- und Erfassungsgrenzen ermittelt werden. Die Gleichspannungspolarographie ( $DC_T$ ) diente vornehmlich der Abklärung des Mechanismus der Elektrodenreaktion, während die wesentlich empfindlichere Differentielle Pulspolarographie (DPP) zur analytischen Erfassung der 3,5-Dinitrobenzoesäureamide herangezogen wurde.

Als Solvens für die Registrierung I-E-Kurven organischer Verbindungen hat sich im Arbeitskreis von Prof. Oelschläger eine Mischung von Britton-Robinson-Puffern (BRP)<sup>59</sup> unter Zusatz von 10-50% eines geeigneten Solubilisators bewährt. Bei den nachfolgenden Untersuchungen wurden durch einen 40%igen Zusatz von Methanol gut reproduzierbare I-E-Kurven erzielt. Bei einem zu geringem Methanolzusatz fallen einige der in Wasser schwerlöslichen Amide (Desipramin, Mexiletin) nach kurzer Zeit aus. Ein weiterer brauchbarer Solubilisator ist Acetonitril. Dagegen reagiert Dimethylformamid in alkalischen Puffern mit den zu untersuchenden Verbindungen zu farbigen Produkten und entfällt daher als Lösungsvermittler. Nach Angaben der Literatur entstehen Meisenheimer-Komplexe<sup>60</sup>.

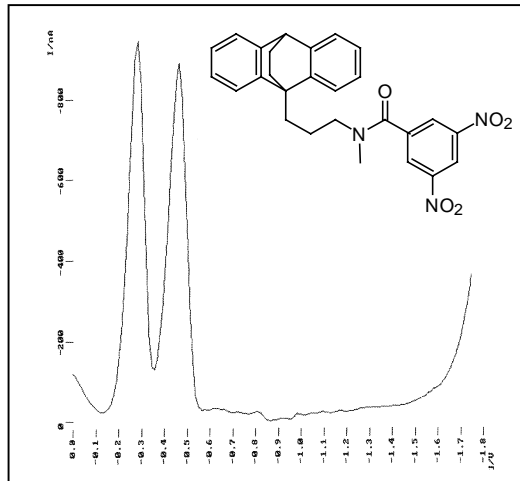
zeigt als Beispiel die bei pH 7,03 im DPP-Modus aufgenommenen Kurven der synthetisierten Amide. Alle weisen im Bereich von -0,22V bis -0,60V (gegen Ag/AgCl) zwei Peaks (Peak 1, Peak 2) aus, die im  $DC_T$ -Modus als Stufen (Stufe 1, Stufe 2) weniger deutlich erkennbar sind (Abb. 16). Die Halbstufenpotentiale unterscheiden sich nur wenig (Tab. 11). Das 3,5-Dinitrobenzoesäureamid des Desipramin wird bei -0,6 V, dem unedelsten Potential reduziert.



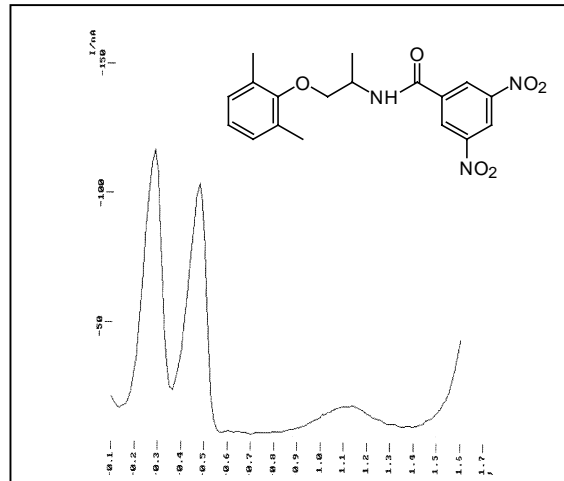
Prilocain-Derivat



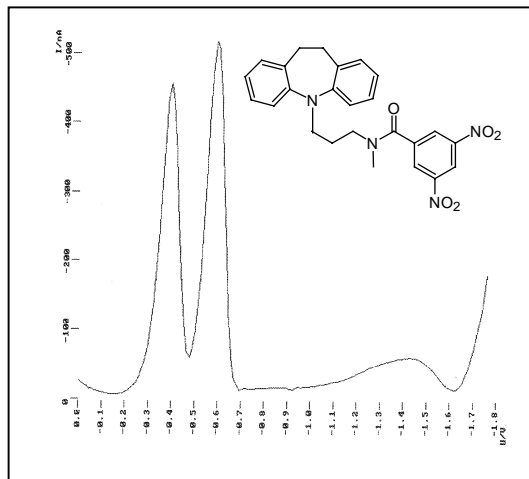
Baclofen-Derivat



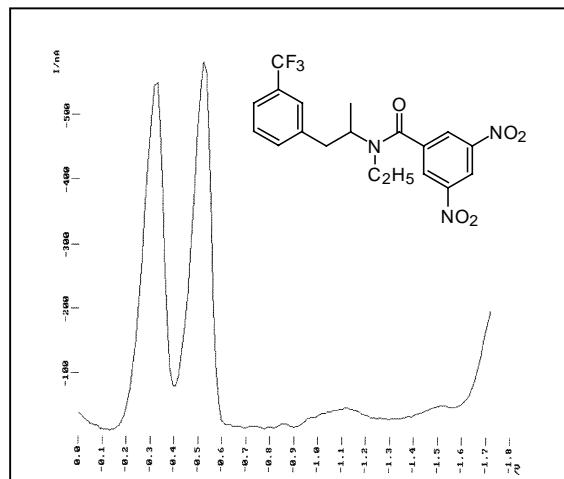
Maprotilin-Derivat



Mexiletin-Derivat

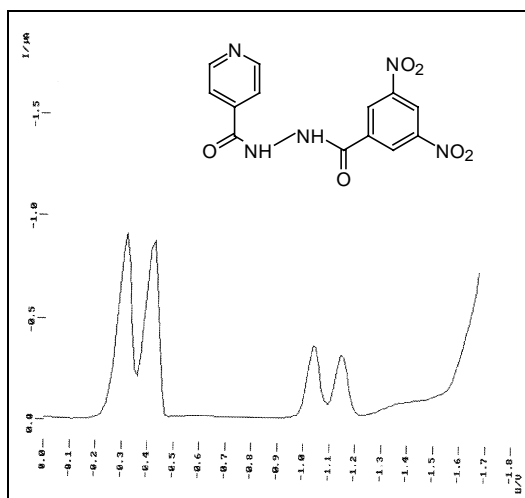


Desipramin-Derivat

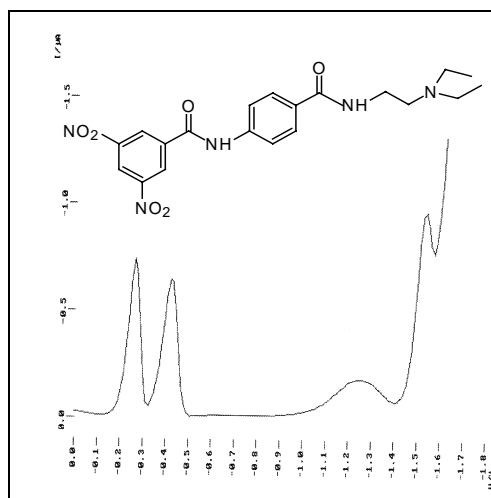


Fenfluramin-Derivat

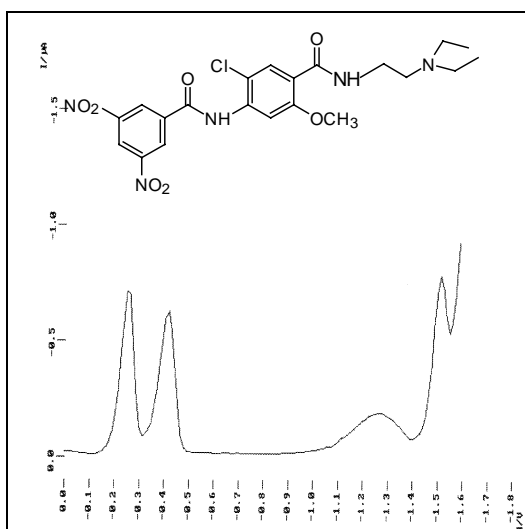
**Abb. 12:** DPP-Polarogramme der 3,5 Dinitrobenzoesäureamide (pH 7,03; BRP; 40 % Methanolzusatz)



Isoniazid-Derivat



Procainamid-Derivat



Metoclopramid-Derivat

Abb 12: Fortsetzung

<b>Gleichstrompolarographie (DC<sub>T</sub>)</b>				
Substanz	Stufe 1 [V]	Stufe 2 [V]	Stufe 3 (präsent)	Stufe 4 (präsent)
DNB-Metoclopramid	-0,22	-0,376	ja	ja
DNB-Procaïnamid	-0,23	-0,38	ja	ja
DNB-Prilocain	-0,24	-0,45	angedeutet	nein
DNB-Maprotilin	-0,24	-0,40	nein	nein
DNB-Baclofen	-0,25	-0,39	nein	nein
DNB-Mexiletin	-0,25	-0,42	ja	nein
DNB-Isoniazid	-0,275	-0,34		nein
DNB-Fenfluramin	-0,28	-0,47	angedeutet	nein
DNB-Desipramin	-0,34	-0,56	ja	nein
<b>Differentielle Puls polarographie (DPP)</b>				
Substanz	Peak 1 [-V]	Peak 2 [-V]	Peak 3 (präsent)	Peak 4 (präsent)
DNB-Metoclopramid	-0,26	-0,42	ja	ja
DNB-Procaïnamid	-0,27	-0,43	ja	ja
DNB-Prilocain	-0,28	-0,47	angedeutet	nein
DNB-Maprotilin	-0,29	-0,47	nein	nein
DNB-Baclofen	-0,28	-0,43	nein	nein
DNB-Mexiletin	-0,28	-0,48	ja	nein
DNB-Isoniazid	-0,31	-0,42		nein
DNB-Fenfluramin	-0,32	-0,52	angedeutet	nein
DNB-Desipramin	-0,40	-0,60	ja	nein

Tab. 11: Auswertung der polarographischen Kurven (pH 7,03, gegen Ag/AgCl)

Bei einigen Verbindungen treten bei negativerer Spannung noch ein oder zwei zusätzliche Peaks auf. Ein flacher breiter Peak (Peak 3) fällt in den Polarogrammen der Amide von Metoclopramid, Procaïnamid, Mexiletin und Desipramin auf, während er bei Prilocain und Fenfluramin nur schwach ausgeprägt ist und bei



allen anderen Derivaten fehlt. Peak 3 liegt zwischen -1,1V und -1,45V (pH 7,03, Ag/AgCl).

Bei Metoclopramid und Procainamid tritt am Endanstieg der polarographischen Kurven noch ein Peak 4 auf. Beide Amide sind durch eine tertiäre Aminogruppe charakterisiert.

Im DPP-Polarogramm des Isoniazid erscheinen neben den Peaks 1 und 2 bei negativerem Potential noch zwei weitere deutlich ausgeprägte Peaks, die sich auch von den Peaks 3 und 4 der anderen Amide unterscheiden. Nach Angaben der Literatur wird Isoniazid in zwei Schritten über das Säureamid bis zum Aldehyd reduziert, die Substanz nimmt dabei 4 Elektronen auf (vgl. Abb. 13)<sup>61</sup>, wobei die N-N-Bindung gespalten wird. Von Oelschläger und El-Hossny wurde eine solche unerwartete Spaltung bei der Reduktion des N-Nitroso-Ketamin beobachtet, das als Intermediat bei der polarographischen Gehaltsbestimmung des Injektionsnarkotikums Ketamin auftritt. Hier war in der DPP nur ein gut auswertbarer Peak sichtbar. Als zweites Produkt wurde Hydroxylamin gefaßt<sup>62</sup>.

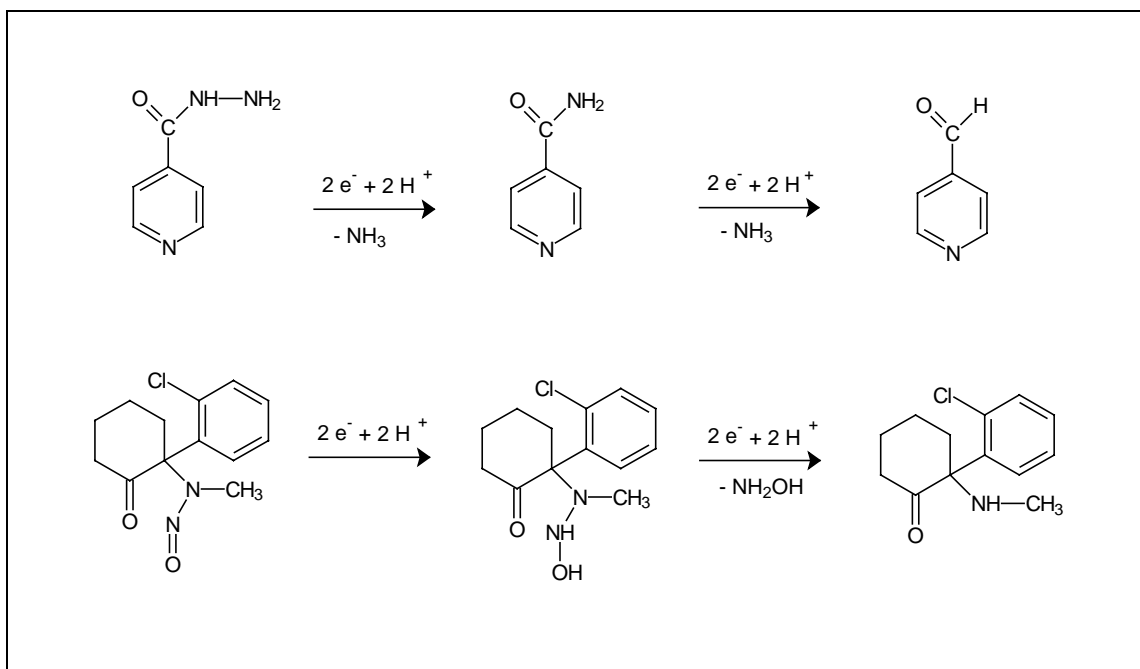


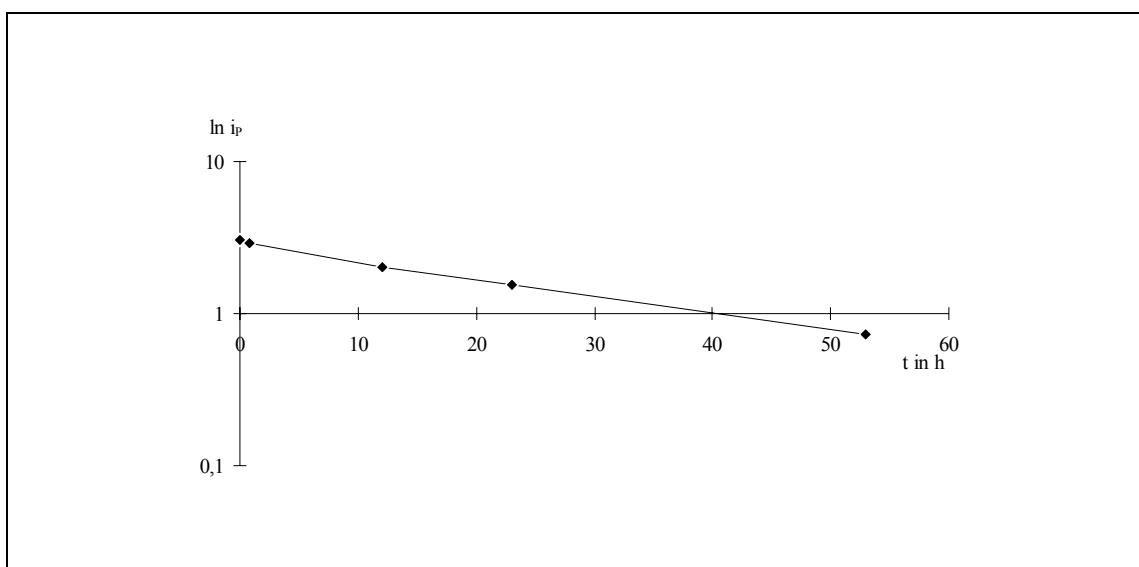
Abb. 13: N-N-Spaltungen an der DME (oben: Isoniazid, unten: N-Nitroso-Ketamin)

Die beiden Peaks von Isoniazid sind diffusionskorreliert und ermöglichen daher dessen polarographische Bestimmung. Somit erübrigte sich eine Derivatisierung

mit 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid. Andere Hydrazide, z.B. der Monoamin-oxidase-Hemmer Isocarboxazid (Marplan<sup>®</sup>, in Dänemark und Großbritannien zugelassen) sind nicht an der DME reduzierbar<sup>63</sup>.

### 3.3.2 Stabilität der Depolarisatoren im Katholyten

Die Voraussetzung einer reproduzierbaren polarographischen Messung ist die Stabilität des Depolarisators im analytisch gewünschten pH-Bereich. Zur Abklärung dieser entscheidenden Frage wurden als Paradigmen die DNB-Derivate von Procainamid, Mexiletin und Prilocain in analytischen Konzentrationen in BRP von pH 4, 7 und 10 unter Zusatz von 40% Methanol gelöst und die I-E-Kurven (DPP) sofort und nach 24 Stunden (Aufbewahrung unter N<sub>2</sub>) registriert. Es resultierten in allen untersuchten Beispielen eine absolute Identität der Kurven. Auch dünnschichtchromatographischen Untersuchungen (DC-Alufolien, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck) lieferten keine Hinweise auf Instabilität.



**Abb. 14:** Zersetzung von 3,5-Dinitrobenzoylprocainamid in 0,1 M-NaOH (Methanolzusatz 40%)

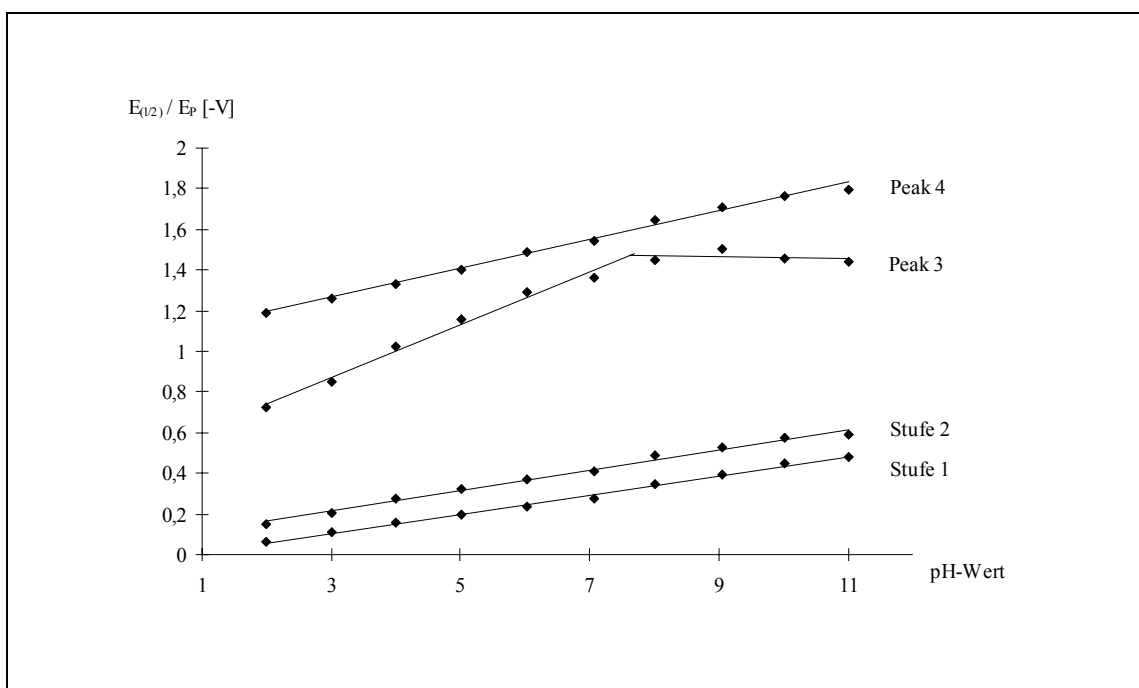
Unter extremen Bedingungen (in 0,1 M-HCl und 0,1 M-NaOH, Zusatz von 40% Methanol, RT) trat eine Spaltung der Amidbindung ein. Abb. 14 zeigt die Hydrolyse des DNB-Derivats von Procainamid in alkalischer Lösung. Nach 23 h betrug der Spitzenstrom  $i_p$  46% der Startmessung (nach 5'), und nach 53 h hatte sich der

Wert auf 31% erniedrigt (Peak 1). Der  $\ln i_p$  war der Reaktionszeit ( $t$ ) indirekt proportional. Die Graphik spricht daher für eine Zersetzungskinetik erster Ordnung. In zeitgleich registrierten Dünnschichtchromatogrammen wurde 3,5-Dinitrobenzoesäure als Produkt detektiert.

### 3.3.3 Einfluß des pH-Wertes auf die Halbstufenpotentiale

Wichtige Rückschlüsse auf die Elektrodenreaktion können aus dem Einfluß des pH-Wertes auf das Halbstufenpotential gezogen werden. So ist zum Beispiel eine Ermittlung der am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reduktion beteiligten Protonen möglich<sup>64</sup> (siehe 3.3.7).

Die Untersuchungen wurden am Beispiel des DNB-Procaïnamid im pH-Bereich von 2-11 durchgeführt, da dieses Amid alle 4 Stufen im Polarogramm aufweist. Es wurde in BRP mit einem 10 %igem Zusatz (v/v) von Methanol gearbeitet.



**Abb. 15:** Beziehung zwischen Peakpotential und pH-Wert einer  $10^{-5}$  M-Lösung des DNB-Procaïnamid (BRP bzw. 0,1 M-HCl unter Zusatz von 10% Methanol)

Alle vier Stufen treten über den gesamten pH-Bereich auf. Der Anstieg von Stufe 3 wird mit zunehmendem pH-Wert flacher, die Stufe damit undeutlicher, so daß

---

eine Auswertung der  $DC_T$ -Polarogramme schwierig ist. Deshalb wurden bei Stufe 3 und bei Stufe 4, die ebenfalls schlecht ausgeprägt ist, die DPP-Polarogramme zur Auswertung herangezogen.

Abb. 15 zeigt die Abhängigkeit der Halbstufenpotentiale bzw. der Peakpotentiale vom pH-Wert.

Die Stufen 1 und 2 und 4 lassen eine lineare Abhängigkeit vom pH-Wert erkennen. Der Anstieg der Geraden wurde mit  $0,0564V/pH$  bzw.  $0,0494V/pH$  bestimmt<sup>65</sup>. Bei Kenntnis der ausgetauschten Elektronen und des Durchtrittsfaktors  $\alpha$  läßt sich die Anzahl der am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligten Protonen ermitteln.

Peak 3 dürfte in Abhängigkeit vom pH-Wert durch den Depolarisator und seine protonierte Form verursacht werden. Bis zu einem pH-Wert von ca. 7 ergibt der Graph von  $E_{1/2}$  gegen pH eine steil ansteigende Gerade ( $0,130V/pH$ ), bei höheren pH-Werten besteht keine Abhängigkeit mehr. Nach Nürnberg<sup>66</sup> läßt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden der  $pK_a$ -Wert der Substanz ermitteln, er beträgt hier ungefähr 7,6.

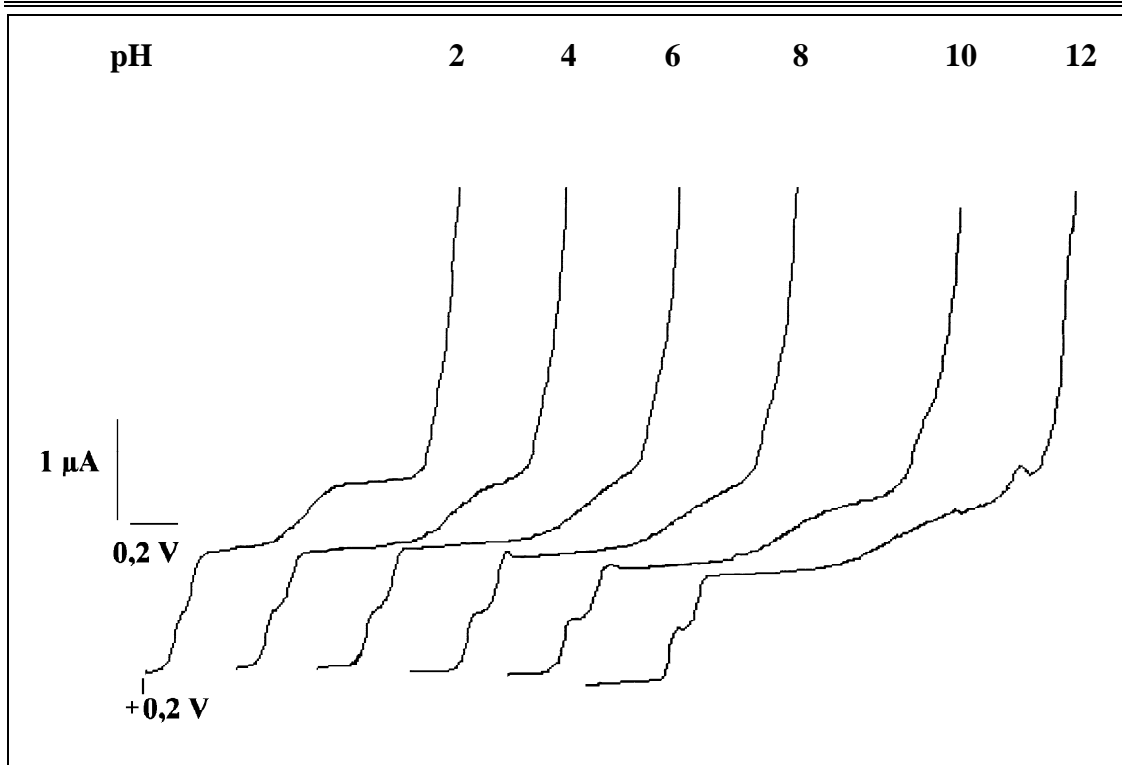


Abb. 16: DCT-Polarogramme von 3,5-Dinitrobenzoylprocainamid bei versch. pH-Werten

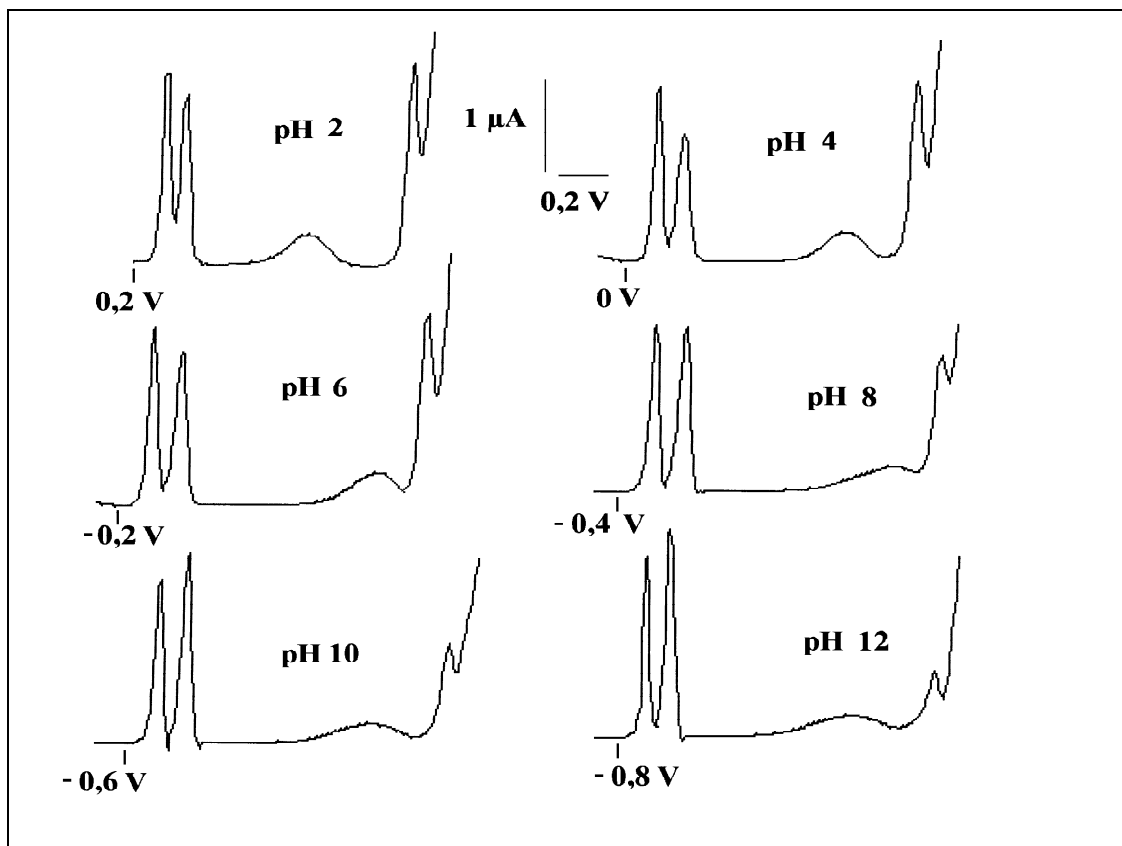
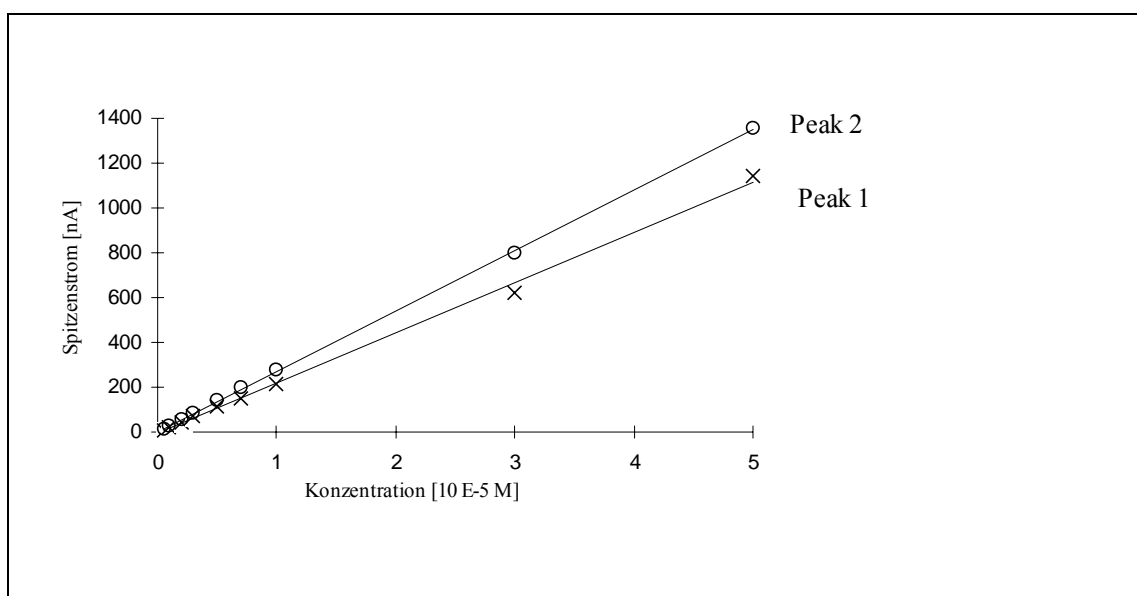


Abb. 17: DPP-Polarogramme von 3,5-Dinitrobenzoylprocainamid bei versch. pH-Werten

### 3.3.4 Konzentrationsabhängigkeit des Grenz- bzw. Spitzenstromes

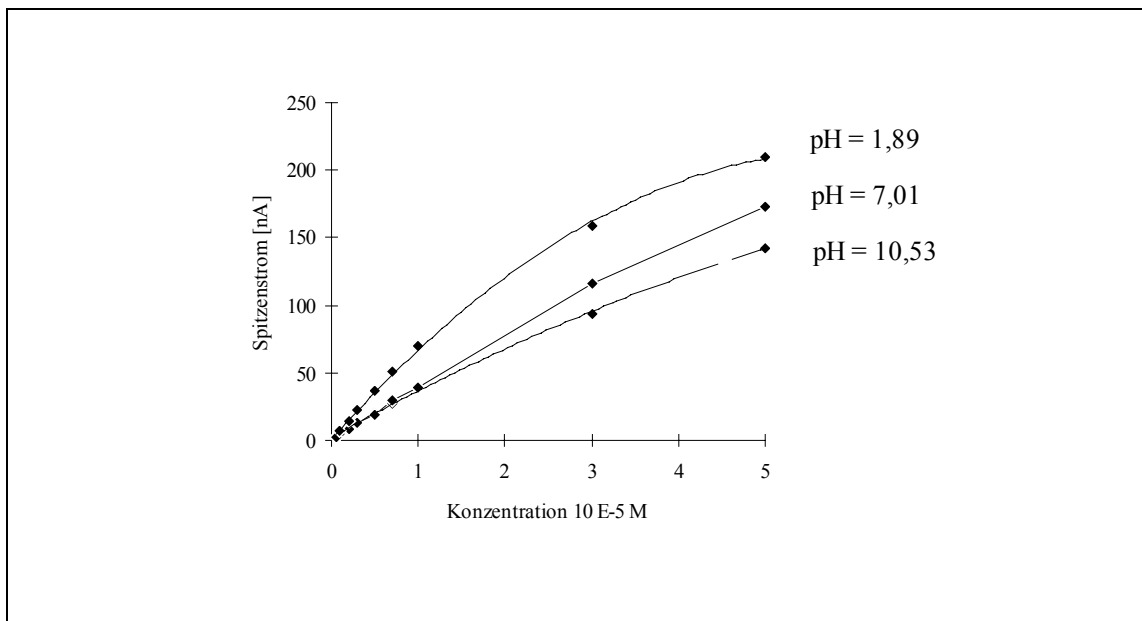
Die Konzentrationsabhängigkeit wurde mittels DPP bei drei verschiedenen pH-Werten (1,89; 7,01; 10,53) im Konzentrationsbereich von  $5 \cdot 10^{-7}$  M bis  $1 \cdot 10^{-3}$  M untersucht.

Für Peak 1 und 2 besteht über den gesamten untersuchten pH-Bereich eine lineare Abhängigkeit des Spitzenstromes von der Depolarisatorkonzentration im Bereich von  $5 \cdot 10^{-7}$  M bis  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Abb. 18 zeigt als Beispiel ein Diagramm für das DNB-Proccainamid bei pH=1,89. Quantitative Bestimmungen sind in diesem Konzentrationsbereich störungsfrei möglich. Oberhalb von  $5 \cdot 10^{-5}$  M verhielt sich der Spitzenstrom nichtlinear zur Konzentration.



**Abb. 18:** Abhängigkeit des Spitzenstromes von Peak 1 ( $R^2 = 0,9973$ ) und Peak 2 ( $R^2 = 0,9998$ ) von der Konzentration an DNB-Proccainamid (BRP; pH 1,89; 40% Methanolzusatz)

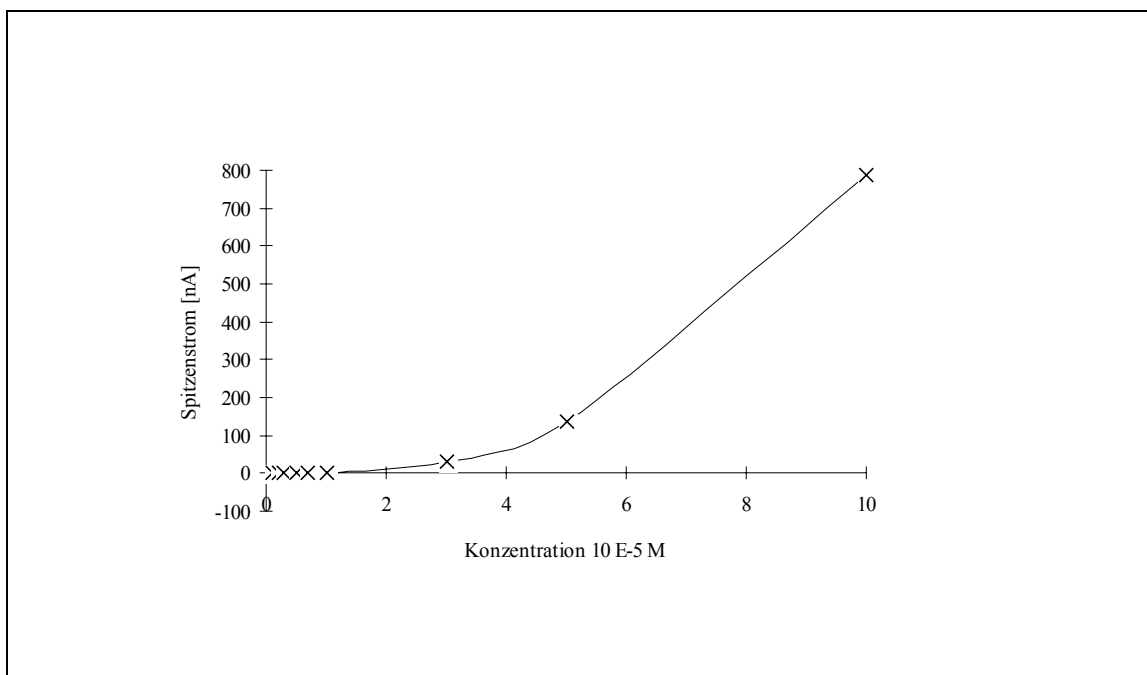
Aus Abb. 19 geht hervor, daß für Peak 3 bei einer DPP-Bestimmung der DNB-Derivate im untersuchten Konzentrationsbereich keine Linearität mehr zwischen  $i_p$  und  $c$  besteht. Nur in dem sehr engen Bereich von  $5 \cdot 10^{-7}$  M bis ca.  $7 \cdot 10^{-6}$  M ist eine direkte Proportionalität zwischen Spitzenstrom und Konzentration gegeben.



**Abb. 19:** Abhängigkeit des Spitzenstromes von Peak 3 von der Konzentration an DNB-Procaïnamid bei verschiedenen pH-Werten (BRP; 10% Methanolzusatz)

Für Peak 4, der nur bei den Amiden von Procainamid und Metoclopramid auftritt, wurde bei pH 1,89 Linearität zwischen  $i_p$  und  $c$  im Bereich von  $5 \cdot 10^{-7}$  M bis  $3 \cdot 10^{-5}$  M festgestellt. Bei pH 7,01 reicht der proportionale Bereich nur bis  $1 \cdot 10^{-5}$  M. Im alkalischen Milieu zeigt sich ein völlig anderes Verhalten. Der Peak ist erst ab  $3 \cdot 10^{-5}$  M nachweisbar, die Peakhöhe nimmt dann mit steigender Depolarisatorkonzentration stark zu. Exemplarisch ist das Verhalten des 3,5-Dinitrobenzoesäureamids von Procainamid bei pH 10,53 in Abb. 20 dargestellt.

Aus den vorstehenden Ausführungen resultiert, daß nur Peak 1 bzw. 2 für die quantitative Bestimmung der synthetisierten 3,5-Dinitrobenzoesäureamide in Betracht kommen. Der analytisch nutzbare Konzentrationsbereich liegt im Bereich von  $5 \cdot 10^{-7}$  M bis  $5 \cdot 10^{-5}$  M.



**Abb. 20:** Abhängigkeit des Spitzenstromes von Peak 4 von der Konzentration an DNB-Procaïnamid bei pH 10,53 (BRP; 10% Methanolzusatz)

Zur Ermittlung der Erfassungs- bzw. Nachweisgrenze wurden die Höhe und die Streuung des Blindwertes bei der jeweiligen Spannung herangezogen. Die Berechnung erfolgte in Anlehnung an Geißler nach folgenden Gleichungen<sup>59</sup>.

$$h_N = h_{Bl} + 3_{shBl}$$

$$h_e = h_{Bl} + 6_{shBl}$$

$h_N$  = Meßwert an der Nachweisgrenze

$h_{Bl}$  = Meßwert des Blindwertes

$sh_{Bl}$  = Standardabweichung des Blindwertes

$h_e$  = Meßwert an der Erfassungsgrenze

Unter Einbeziehung der ermittelten Konzentrationsabhängigkeit bewegt sich die Nachweisgrenze bei pH 7 zwischen  $3,4 \cdot 10^{-8}$  M und  $9,7 \cdot 10^{-8}$  M (Tab. 12). Sie liegt somit im Bereich von DPP-Bestimmungen Nitrogruppen enthaltender organischer Substanzen. Whittaker fand 1976 bei der Bestimmung von 1-(4-Nitro-phenyl)-3-pyridin-3-ylmethyl-harnstoff ein Detektionslimit von  $2 \cdot 10^{-8}$  M<sup>67</sup>. Im Bereich von Peak 1 des DNB-Procaïnamids traten kleinere Störungen im Polarogramm auf, deshalb sind hier die ermittelten Nachweisgrenzen etwas höher.



<b>DNB-Derivate von</b>	<b>Peak</b>	<b>Nachweisgrenze ·[10<sup>-8</sup> M]</b>	<b>Erfassungsgrenze ·[10<sup>-8</sup> M]</b>
Mexiletin	1	8,5	13,1
	2	4,6	7,7
Baclofen	1	7,2	11,1
	2	4,6	7,7
Desipramin	1	9,7	14,9
	2	5,1	8,5
Prilocain	1	7,4	11,4
	2	4,9	8,2
Maprotilin	1	5,5	8,5
	2	3,7	6,2
Fenfluramin	1	7,1	12,9
	2	4,3	8,4
Metoclopramid	1	6,3	9,7
	2	4,7	7,8
Procainamid	1	5,6	8,6
	2	4,0	6,7
Isoniazid	1	5,4	8,3
	2	3,4	5,6

**Tab. 12:** Nachweis- und Erfassungsgrenzen der untersuchten Amide bei pH 7,03 (DPP; BRP; Methanolzusatz 40%)

Die niedrigsten mit analytischer Sicherheit bestimmbaren Konzentrationen von 3,5-Dinitrobenzoesäureamiden liegen zwischen  $5,6 \cdot 10^{-8}$  und  $1,49 \cdot 10^{-7}$  M.

### 3.3.5 Einfluß von Tensiden und Ionenstärke

Die Untersuchungen des Tensideinflusses erfolgte wiederum am Beispiel des DNB-Procaïnamid. Dieses Amid wurde gewählt, weil sein Polarogramm alle 4 Stufen zeigt und außerdem nur 10% Solubilisatorzusatz für die Herstellung der Lösung ausreichen. Gelatine wurde zum Katholyten so bemessen zugesetzt, daß die Konzentration den Bereich von 0,01-0,05% abdeckte. Die mit demineralisiertem Wasser hergestellte Gelatinelösung (Merck/Darmstadt) wurde 24 Stunden nach der Herstellung zugegeben. Wie aus Tab. 13 hervorgeht, ergaben sich bei der Registrierung des Grenzstroms ( $DC_T$ ) der beiden positiven Stufen keine signifikanten Veränderungen, wohl aber ein Hinweis auf einen diffusionskontrollierten Reduktionsvorgang.

Gelatinekonzentration	Stufe 1 [ $\mu A$ ]	Stufe 2 [ $\mu A$ ]
0,00	1,20	1,29
0,01	1,18	1,22
0,02	1,18	1,22
0,03	1,22	1,20
0,04	1,16	1,29
0,05	1,22	1,25

Tab. 13: Beeinflussung des Grenzstroms  $i_D$  durch die Gelatinekonzentration

Im Gegensatz zu den positiveren Stufen 1 und 2 zeigt die nur schlecht ausgebildete Stufe 3 eine deutliche Abnahme der Höhe bei steigendem Gelatinezusatz. Im DPP-Modus nimmt der Spitzenstrom  $i_p$  von Peak 3 mit steigender Gelatinekonzentration kontinuierlich ab (Abb. 21). Auch Peak 4 wird durch Gelatinezusatz vollständig unterdrückt.

Bekanntlich sind diffusionsbedingte Ströme unabhängig von der Pufferkonzentration. Um diese Frage zu prüfen, wurde bei gleichbleibendem Methanolzusatz von 10% die Salzkonzentration des eingesetzten BRP (pH = 4,1) durch

Wassergabe kontinuierlich verdünnt (neun Verdünnungen). In der letzten Verdünnung war die Elektrolytkonzentration nur noch 0,012 M im Vergleich zur Startkonzentration von 0,108 M im nicht verdünnten Puffer. Die Kurven des Procainamidderivats waren bei allen untersuchten Pufferkonzentrationen identisch.

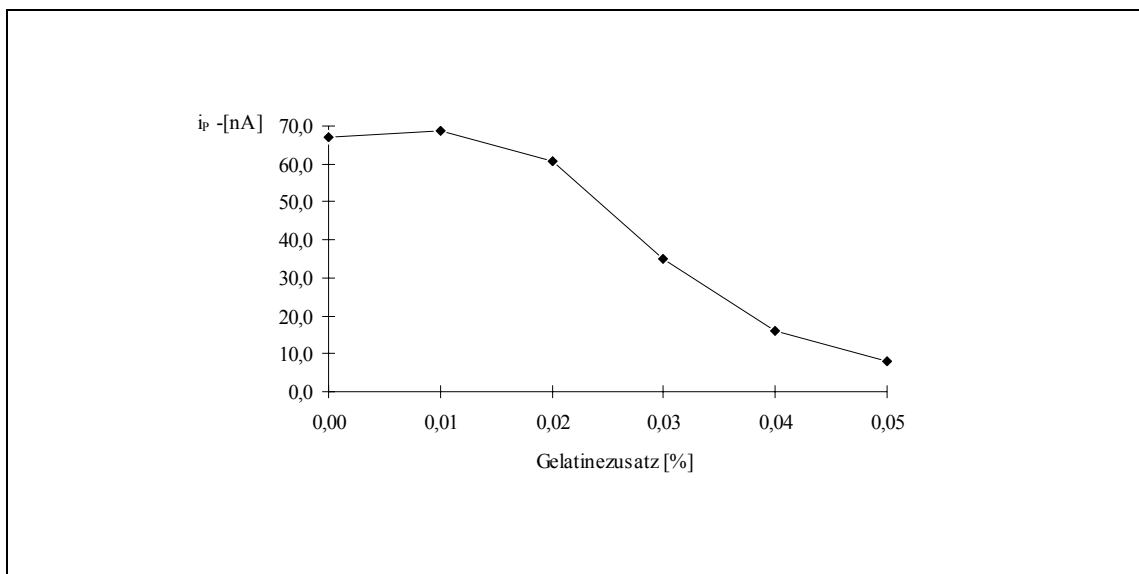


Abb. 21: Einfluß von Gelatine auf  $i_p$  (Peak 3)

### 3.3.6 Abhängigkeit von der Temperatur

Der Einfluß der Temperatur auf den polarographischen Grenz- bzw. Spitzenstrom wird üblicherweise durch den Temperaturkoeffizienten ( $T_k$ ) charakterisiert. Er kann aufgrund nachstehender Gleichung ermittelt werden<sup>68</sup>. Die Multiplikation mit 100 liefert dann den entsprechenden Koeffizienten in %/K.

$$T_k = \frac{d \ln i(T)}{dT} \approx \frac{\ln(i_2/i_1)}{T_2 - T_1}$$

Als Modellsubstanz für die Bestimmung des Temperaturkoeffizienten diente wiederum das DNB-Procainamid, da alle 4 Stufen im Polarogramm auftreten. Es

wurden die Grenz- bzw. Spitzenströme im Temperaturbereich von 20°C bis 50°C ermittelt und deren natürliche Logarithmen gegen die Temperatur aufgetragen. Der Anstieg der Ausgleichsgeraden ergab den Temperaturkoeffizienten.

Im allgemeinen liegen die Temperaturkoeffizienten bei diffusionskontrollierten Vorgängen unter 2%. Temperaturkoeffizienten über 3% (bis zu 30%) resultieren bei kinetischen Strömen, während bei katalytischen oder durch Adsorption bedingten Strömen variable Abhängigkeiten beobachtet werden.

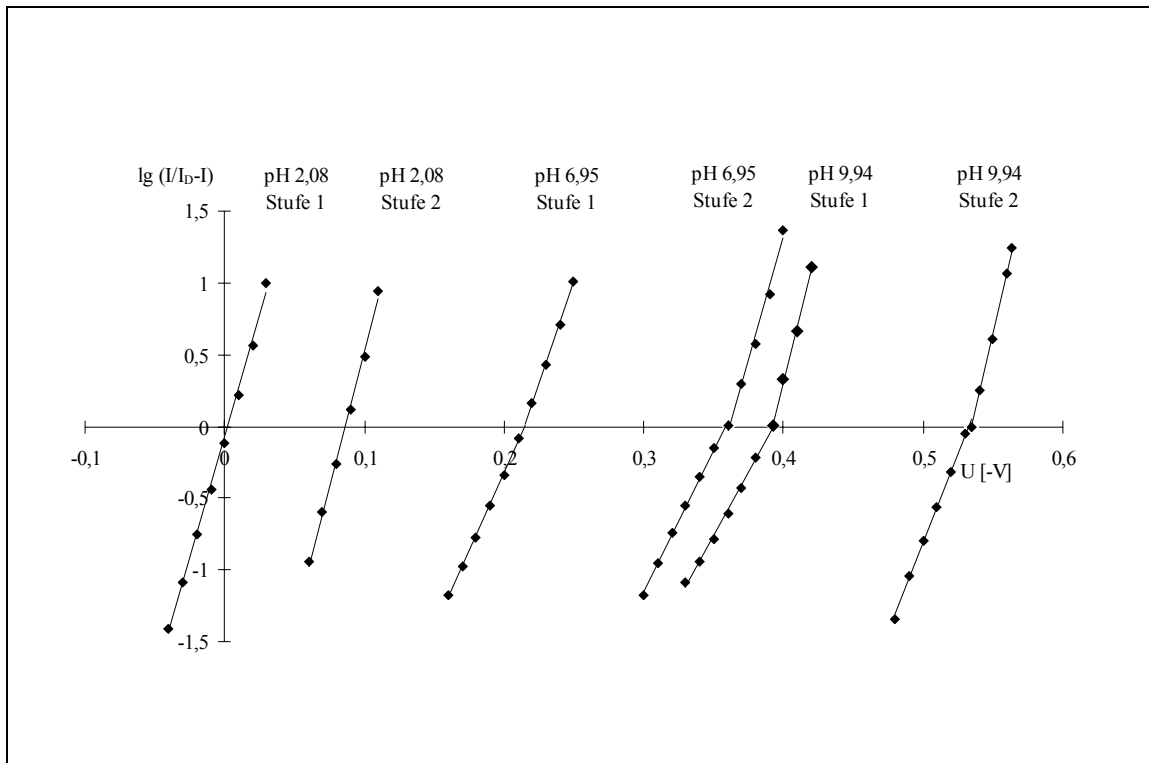
	Peak bzw. Stufe 1		Peak bzw. Stufe 2		Peak 3	Peak 4
pH-Wert	DC <sub>T</sub>	DPP	DPP	DPP	DC <sub>T</sub>	DPP
	Tk [%/K]	Tk [%/K]	Tk [%/K]	Tk [%/K]	Tk [%/K]	Tk [%/K]
4,0	1,66	1,82	1,64	1,88	2,19	3,34
7,0	1,75	1,90	1,75	2,28	2,28	3,69
10,0	2,65	2,25	1,77	1,60	1,71	3,60

Tab. 14: Temperaturkoeffizienten bei verschiedenen pH-Werten

Tab. 14 zeigt die Temperaturkoeffizienten bei 3 verschiedenen pH-Werten. Sie liegen für die Stufen 1-3 um 2 %, entsprechend einem diffusionskontrollierten Grenzstrom. Die Werte von DC<sub>T</sub> und DPP unterscheiden sich nicht wesentlich. Peak 4 weist einen Koeffizienten von über 3 % auf, hier scheinen katalytische Prozesse beteiligt zu sein.

### 3.3.7 Logarithmische Analyse der polarographischen Kurven

Die logarithmische Auswertung von polarographischen Kurven bringt wichtige Informationen über den Reduktionsprozeß. So können sehr genau die Halbstufenpotentiale und, bei bekannter Elektronenzahl, die Durchtrittsfaktoren irreversibler Reaktionen berechnet werden. Weiterhin ist eine Aussage über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion, speziell die Anzahl der beteiligten Protonen möglich.



**Abb. 22:** Logarithmische Analyse der polarographischen Stufen ( $DC_T$ ) bei verschiedenen pH-Werten (DNB-Procaïnamid  $1 \cdot 10^{-5}$  M)

Bei der logarithmischen Analyse einer polarographischen Stufe wird  $\lg(I/I_D-I)$  gegen  $U$  aufgetragen. Eingesetzt wurde als Modellsubstanz das Procainamid-derivat (BRP, pH 2, 4, 7 und 10) mit einem Methanolzusatz von 10%.

Abb. 22 zeigt, daß sich bis pH 7 für beide Stufen annähernd Geraden ergaben, deren Anstiege ( $b$ ) berechnet wurden. Ab  $\text{pH} > 7$  tritt eine Zweiteilung der Graphen ein.

Die Auswertung erfolgte mittels folgender Gleichungen:

$$A = \frac{2,3RT}{\alpha nF} = \frac{0,059}{\alpha n}$$

$$1/b = A \text{ [V]}$$

$\alpha$  = Durchtrittsfaktor

$n$  = Anzahl der beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt umgesetzten Elektronen

$$\frac{\Delta E_{1/2}}{\Delta pH} = - \frac{2,3RTp}{\alpha nF}$$

p = Anzahl der beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt umgesetzten Protonen

Bei dem Term „ $\frac{\Delta E_{1/2}}{\Delta pH}$ “ handelt es sich um die schon bestimmte Abhängigkeit des polarographischen Halbstufenpotentials vom pH-Wert (siehe 3.3.3).

Für die Stufe 1 wurde sie mit 0,056 V/pH und für Stufe 2 mit 0,049 V/pH bestimmt.

Tab. 15 zeigt, daß im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reduktion bei pH 2 und pH 4 zwei Protonen benötigt werden. Ab pH 7 läßt sich für den ersten Anstieg ein Verbrauch von einem Proton ermitteln, für den zweiten Anstieg wurden wieder zwei Protonen bestimmt. Diese Ergebnisse werden gestützt durch die Literatur, wonach bei der Reduktion von Nitrobenzol zu Nitrosobenzol der Verbrauch von zwei Protonen als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angesehen wird<sup>69</sup>. Das Ergebnis der logarithmischen Analyse scheint dies zu bestätigen. Ab pH 7 dürfte bei dem ersten Anstieg nur ein Proton beteiligt sein.

pH-Wert		A [mV]	$n\alpha$	p
2,08	1.Stufe	29,56	1,99	1,9
	2.Stufe	26,81	2,20	1,8
4,07	1.Stufe	30,47	1,94	1,9
	2.Stufe	33,51	1,76	1,5
6,95	1.Stufe/1.Ast	46,14	1,28	1,2
	1.Stufe/2.Ast	35,46	1,66	1,6
	2.Stufe/1.Ast	49,14	1,20	1,0
	2.Stufe/2.Ast	29,24	2,02	1,7
9,94	1.Stufe/1.Ast	57,67	1,02	1,0
	1.Stufe/2.Ast	24,98	2,36	2,2
	2.Stufe/1.Ast	40,49	1,46	1,2
	2.Stufe/2.Ast	23,10	2,55	2,1

Tab. 15: Anstiege (A) und daraus berechnete Faktoren ( $n\alpha$ ) und Anzahl der beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt umgesetzten Protonen (p)

### 3.3.8 Bestimmung des Elektronenverbrauches

#### 3.3.8.1 Korrelationsverfahren

Bei diesem Verfahren wird die im  $DC_T$ -Modus erhaltene Stufenhöhe mit der anderer Depolarisatoren, deren Reduktionsmechanismus bekannt ist, verglichen. Dabei muß die Vergleichssubstanz in der gleichen Konzentration vorliegen, ferner müssen Art und Menge des eventuell zugesetzten Solubilisators gleich sein. Die Diffusionskoeffizienten sollten nicht zu stark differieren.

Die Versuche wurden exemplarisch wiederum mit dem DNB-Procaïnamid durchgeführt. Als Referenzsubstanzen zur Bestimmung der Elektronenzahl dienten Nitrazepam<sup>70</sup> und 3,5-Dinitrobenzoylpiperidin<sup>42</sup>. Beide Depolarisatoren sind eingehend in der Arbeitsgruppe Oelschläger untersucht worden. Ihre Nitrogruppen

werden in 4-elektronigen Schritten zur Hydroxylaminstufe reduziert. Die Bestimmung erfolgte bei den pH-Werten 2 und 7 und 11 (BRP).

Substanz	Nitrazepam	Dinitrobenzoylprocainamid	
	Stufenhöhe [nA]/Elektronen	Stufenhöhe [nA]/Elektronen (ber.)	
	Stufe 1	Stufe 1 + 2	Stufe 3
pH 2,0	352,4 / 4	683,8 / 7,8	330,2 / 3,7
pH 7,0	374,5 / 4	707,1 / 7,6	319,6 / 3,4
pH 10,8	354,3 / 4	687,1 / 7,8	315,5 / 3,6

Tab. 16: Durch Vergleich der Stufenhöhen ermittelter Elektronenverbrauch (DNB-Procainamid  $1 \cdot 10^{-4}$  M, BRP)

Tab. 16 zeigt die Ergebnisse des Vergleichs mit Nitrazepam. Für die Stufen 1 und 2 ergibt sich zusammen ein Verbrauch von 8 Elektronen, für die Stufe 3 wurden ca. 4 Elektronen berechnet. Die Korrelation gegen 3,5-Dinitrobenzoylpiperidin führte zu etwas niedrigeren Werten, aber die berechnete Elektronenzahl ist in etwa gleich. Die Abweichungen resultieren aus den unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten.

### 3.3.8.2 Coulometrie

Zu genaueren Ergebnissen als das oben aufgeführte Korrelationsverfahren führt die aufwendigere mikroculometrische Bestimmung. Hierbei wird die Substanz an einer großflächigen Quecksilberelektrode bei konstantem Potential reduziert. Die Berechnung des Elektronenverbrauchs erfolgt mit Hilfe des Faradayschen Gesetzes nach folgender Gleichung:

$$n = \frac{M \cdot Q}{F \cdot m}$$

- n = Elektronenanzahl pro Molekül
- M = Molmasse des Depolarisators
- Q = experimentell bestimmte Ladung
- F = Faraday-Konstante
- m = Masse des Depolarisators



Die Coulometrie wurde bei 2 verschiedenen pH-Werten (pH 2,0 und 7,0; BRP; Methanolzusatz 50%) durchgeführt, und die Elektrolysespannung wurde so eingestellt, daß sie entweder negativer als das Potential der 2. Stufe oder der 3. Stufe ist.

Tab. 17 zeigt, daß die ersten beiden Reduktionsstufen auf einem Verbrauch von insgesamt 8 Elektronen basieren. Die Lösung färbte sich während der Reduktion zuerst gelb, später violett, ein Hinweis auf eine chemische Reaktion der Endprodukte, z. B. auf Bildung von Azo- und Azoxyverbindungen. So fanden Oelschläger und Mitarbeiter, daß bei der polarographischen Reduktion von Nitrazepam u. a. auch das gelb gefärbte Azoxyderivat entsteht<sup>70</sup>.

Die coulometrische Bestimmung bei einer Spannung, die nach der 3. Reduktionsstufe liegt, wurde in 0,1 M-HCl durchgeführt, da hier die Trennung der Stufe vom Endanstieg genügend groß ist. Der aus der experimentell ermittelten Ladung berechnete Elektronenverbrauch beträgt 12,6 bzw. 11,2.

pH-Wert	Einwaage (mg)	Ladung (C)	Elektronenverbrauch
2,0	11,9	18,8	7,03
7,0	9,3	16,9	8,08

Tab. 17: Elektronenverbrauch durch Coulometrie ermittelt (Elektrolysespannung nach der 2. Stufe)

### 3.3.9 Ergebnisse der polarographischen Untersuchungen

Voraussetzung für die reproduzierbare Gehaltsbestimmung eines Depolarisators ist die Abhängigkeit des Grenzstroms von den von Heyrovsky aufgestellten Kriterien, die ihren Ausdruck in der Ilković-Gleichung gefunden haben.

$$\bar{i}_D = 607 \cdot n \cdot m^{\frac{2}{3}} \cdot t^{\frac{1}{6}} \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot c$$

- $i_D$  = Stärke des mittleren Diffusionsgrenzstromes [ $\mu\text{A}$ ]
- $n$  = Anzahl der umgesetzten Elektronen
- $m$  = Ausflußgeschwindigkeit des Quecksilbers [ $\text{mg/s}$ ]
- $t$  = Tropfzeit [ $\text{s}$ ]
- $D$  = Diffusionskoeffizient des Depolarisators [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]
- $C$  = Konzentration des Depolarisators [ $\text{mol/l}$ ]

Die Überprüfung der Kriterien bei der Modellsubstanz Dinitrobenzoylprocainamid ergab eine Diffusionsabhängigkeit des mittleren Grenzstroms für die Stufen 1 und 2. Dafür sprachen die lineare Konzentrationsabhängigkeit, die konstante Stufenhöhe bei wechselnden Pufferkonzentrationen sowie bei Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen. Auch der Temperaturkoeffizient zwischen 1%/K und 2%/K ist ein Indiz für einen Diffusions-Grenzstrom. Die Höhe des Hg-Niveaus beeinflusst den Grenzstrom über die Änderung der Ausflußgeschwindigkeit und der Tropfzeit. Bei meinen Untersuchungen ergab sich bei pH 4 für Höhen zwischen 40 - 70 cm eine lineare Abhängigkeit des Grenzstroms von der Quadratwurzel aus der Höhe des Hg-Niveaus, ebenfalls ein positives Kriterium. Die mit zwei Verfahren (Korrelationsverfahren, Mikro coulometrie) durchgeführte Bestimmung des Elektronenverbrauchs kommt zu einem Verbrauch von insgesamt 8 Elektronen. Da beide Stufen gleich groß sind, erfolgt demnach eine Reduktion in zwei 4-elektronigen Stufen. Eine Isolierung des Endproduktes gelang aufgrund dessen

chemischer Reaktivität nicht. Somit deutet der Elektronenverbrauch auf eine Reduktion beider Nitrogruppen zur Hydroxylaminstufe hin. Eine gewisse Bestätigung findet sich in der Literatur<sup>70</sup>. Versuche, das Endprodukt in situ durch Acylierung mit Acetanhydrid zu fassen, schlugen fehl.

Die Stufen 3 und 4 sind nicht diffusionskontrolliert. Der Grenzstrom der Stufe 3 verhält sich nur innerhalb eines kleinen Bereiches konzentrationsproportional. Durch Zusatz von Gelatine läßt sich die Stufe komplett unterdrücken. Beide Beobachtungen sprechen für eine Hemmung des Reduktionsvorganges. Schon Heyrovsky und Mitarbeiter fanden 1970 beim Studium der Reduktion von Phenylhydroxylamin einen durch Adsorption gehemmten Elektrodenprozeß<sup>71</sup>. Sie führten das auf Adsorption des Depolarisators oder des im Verlauf der Reduktion durch Dimerisation gebildeten Hydrazobenzols zurück. Als weiteres in Abhängigkeit vom pH-Wert gebildetes Produkt fanden sie Benzidin. Durch Coulometrie konnte ich nachweisen, daß der Stufe 3 primär eine Reduktion unter Verbrauch von 4 Elektronen zugrunde liegt. Es darf also angenommen werden, daß beide Hydroxylaminogruppen reduziert werden und so die Diaminverbindung gebildet wird. Aus dem Katholyten konnten allerdings infolge von Polymerisation keine definierten Produkte isoliert werden. Erstaunlich ist, daß bei einigen Verbindungen, z. B. bei DNB-Procaïnamid und –Metoclopramid, diese Reduktionsstufe über den gesamten pH-Bereich auftritt. In der Literatur sind Reduktionen von aromatischen Nitroverbindungen bis zur Aminstufe nur im pH-Bereich bis etwa pH 7 beschrieben worden.

Stufe 4 tritt nur bei den 3,5-Dinitrobenzoesäureamiden des Metoclopramid und Procaïnamid auf. Es handelt sich um eine katalytische Wasserstoffabscheidung an der DME. Beide Substanzen enthalten eine tertiäre Aminogruppe. Dieses basische Strukturelement setzt bekanntlich das Potential  $2\text{H}^+/\text{H}_2$  herab, so daß Wasserstoffionen bereits bei positiverem Potential reduziert werden<sup>72</sup>. Nach von Stackelberg ist die Adsorption der Base an der DME Voraussetzung für eine Katalyse. Das adsorbierte Molekül wird protoniert und bei positiverem Potential als die freien Protonen reduziert (siehe Abb. 23). Nach Abgabe von Wasserstoff liegt die als Katalysator fungierende Base wieder im Ausgangszustand vor. Für den angegebenen Mechanismus spricht das Verhalten der Stufe 4 nach Zugabe von

Gelatine. Eine Adsorption der Base an der Oberfläche, Voraussetzung für den Mechanismus, ist dadurch nicht mehr gegeben, folglich wird die Stufe unterdrückt (vgl. 3.3.5). Auch der Temperaturkoeffizient von  $>3\%/K$  bestätigt den katalytischen Ursprung der Stufe.

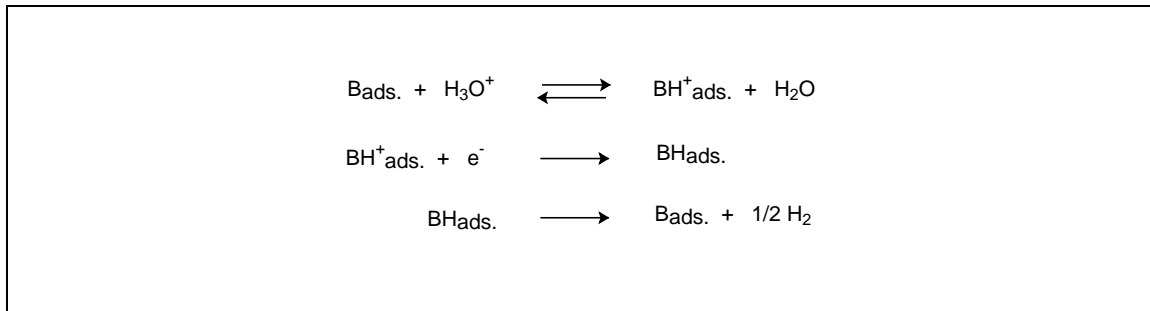


Abb. 23: Katalytische Wasserstoffabscheidung nach von Stackelberg<sup>73</sup>

### **3.4 Polarographische Gehaltsbestimmung von Aminen**

#### **3.4.1 Abtrennung der 3,5-Dinitrobenzoesäure mit Hilfe eines basischen Ionenaustauschers**

Die als Nebenprodukt bei der Derivatisierung entstehende und wegen ihrer polarographischen Aktivität störende 3,5-Dinitrobenzoesäure mußte vor der polarographischen Bestimmung vollständig entfernt werden, da sich eine Simultanbestimmung des Derivats und der 3,5-Dinitrobenzoesäure als unmöglich erwies. Die Abtrennung gelang durch Einsatz eines stark basischen Anionenaustauschers (Amberlite® IRA-402, Merck/Darmstadt). Die Wiederfindungsrate des Amids nach Austauscherpassage, durch HPLC bestimmt, beträgt 98,6 % ( $s_{\text{rel.}}$  0,4%). Es wurde also nur ein geringer Produktanteil adsorbiert. Die 3,5-Dinitrobenzoesäure war im Eluat durch HPLC nicht mehr nachweisbar.

Mit der Modellsubstanz Procainamid wurde die Wiederfindungsrate der gesamten polarographischen Gehaltsbestimmung (Derivatisierung, Austauscherpassage, polarographische Bestimmung) mit 95,2% ( $s_{\text{rel.}} = 0,74\%$ ) bestimmt. Damit ergab sich für die polarographische Bestimmung von Procainamid-HCl durch Überführung in das 3,5-Dinitrobenzoylderivat ein systematischer Fehler von 4,8%.

#### **3.4.2 Dünnschichtchromatographische Abtrennung**

Arzneistoffe mit Carboxylfunktion können nach Derivatisierung zwangsläufig nicht über einen Anionenaustauscher von der 3,5-Dinitrobenzoesäure getrennt werden. Als Trennoperation bietet sich in diesem Fall die dünnschichtchromatographische Abtrennung des Amids an. Schon 1974 hatte die Arbeitsgruppe Oelschläger gezeigt<sup>74,75</sup>, daß sich auf diese Weise polarographisch aktive Substanzen, z. B. Nitrazepam und sein Hauptmetabolit 7-Amino-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on nach DC-Trennung auf verschiedenen Sorptionsmitteln wie Kieselgel, Aluminiumoxid oder Cellulose und Elution mit DMF mit hinreichender Genauigkeit elektroanalytisch bestimmen lassen. Der Trennvorgang wurde durch das Trägermaterial (Polyester, Aluminium) nicht

beeinflusst. Die Wiederfindungsraten lagen in Abhängigkeit vom Sorbens bei über 90 %. Bei Platten, die aktivierte Zinksilikate als Fluoreszenzindikatoren enthalten, muß das bei der Elution in Lösung gegangene Zink, daß bei ca.  $-1V$  (pH 4; Ag/AgCl) reduziert wird, durch Zugabe von EDTA maskiert werden. Die Methode der dünn-schichtchromatographischen Trennung auf DC-Folien eignet sich vor allem für kleine Mengen Analysenmaterial und bringt gegenüber der säulenchromatographischen Trennung eine erhebliche Zeitersparnis. Voraussetzung für ein genaues Arbeiten ist, daß sich der jeweilige Depolarisator durch ein geeignetes Eluens, vorzugsweise DMF oder DMSO, vom Sorptionsmittel quantitativ ablösen läßt. Weiterhin muß für jeden Stoff ein eigenes chromatographisches System gefunden werden.

Als Modellsubstanz für die Untersuchungen diene das primäre Amin Mexiletin. Nach Umsetzung mit DNBA wurde die Wiederfindungsrate bestimmt. Hierzu wurden 11,4 mg der Substanz in 50 ml Acetonitril gelöst, entsprechend einer  $1 \cdot 10^{-3}$  M Lösung. 20,0 ml dieser Stammlösung wurden mit 17 mg DNBA, 120  $\mu$ l DMAP-Lösung (0,02% in Acetonitril) und 7  $\mu$ l Pyridin versetzt. Die Versuche unter 3.2.2 hatten gezeigt, daß die Reaktion bei Raumtemperatur nach spätestens 15 min beendet ist. Die Lösung wurde dann auf 25,0 ml aufgefüllt ( $8 \cdot 10^{-4}$  M) und 5 mal je 10,0  $\mu$ l auf eine Platte zur Dünnschichtchromatographie aufgetragen (DC-Alufolien, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck/Darmstadt). Die anschließende Trennung erfolgte mit dem Fließmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH/ konz. NH<sub>3</sub> (85/14/1). Nach der UV-Detektion sind deutlich 4 Flecken zu erkennen, die mit Referenzsubstanzen als 3,5-Dinitrobenzoesäure, DMAP, Pyridin und das 3,5-Dinitrobenzoesäureamid des Mexiletin identifiziert wurden. Die dem 3,5-Dinitrobenzoesäureamid entsprechenden Flecken wurden mit Sicherheitszone ausgeschnitten und im Polarographiegefäß mit 5,0 ml Methanol versetzt. Nach 5 Minuten Ultraschallbehandlung hatte sich die gesamte Substanz gelöst. Nach der Messung entnommene, gespülte und getrocknete Kieselgelfolie zeigte keine Fluoreszenzlöschung mehr. Nach Zugabe von 5,0 ml BRP (pH 7,2) wurde die Probe 5 mal vermessen ( $8 \cdot 10^{-7}$  M). Die Auswertung erfolgte durch externe Kalibrierung mit Hilfe einer Eichgeraden.

Die statistische Auswertung erfolgte nach den unten aufgeführten Gleichungen (I,J=5). Die polarographische Analyse von Aminin besteht aus einer Folge verschiedener Arbeitsschritte, die naturgemäß fehlerbehaftet sind. Es wurde versucht, den zufälligen Fehler der dünn-schichtchromatographischen Trennung inkl. der Auftragung (10 µl !) und den zufälligen Fehler der polarographischen Messung zu berücksichtigen. Um diese Fehler näherungsweise abschätzen zu können, wurden zwei Fehlervarianzen  $\sigma_E^2$  und  $\sigma_A^2$  eingeführt.  $\sigma_E^2$  ist die Varianz für den eigentlichen Meßfehler der polarographischen Messung,  $\sigma_A^2$  ist die Varianz für die Streuung der dünn-schichtchromatographischen Trennung. Im vorliegenden Fall der Bestimmung von Mexiletin ergab sich als Schätzung für  $\sigma_A^2$  ein Wert von 0,036 und für  $\sigma_E^2$  von 0,10. Das bedeutet, daß die Streuung der eigentlichen polarographischen Messung in diesem Konzentrationsbereich größer ist als die Streuung der dünn-schichtchromatographischen Trennung. Um den Fehler zu minimieren, erscheint es also sinnvoller, mehrere Messungen anstelle vieler Trennungen durchzuführen.

$$y_{ij} = \mu + A_i + E_{ij}$$

$$\bar{Y}_j = \frac{1}{J} \sum_{j=1}^J Y_{ij}$$

$$\bar{Y} = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I \bar{Y}_j$$

$$s_1^2 = J \sum_{I=1}^I (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2$$

$$s_2^2 = \sum_{I=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{Y}_{ij} - \bar{Y}_i)^2$$

$$\hat{\sigma}_E^2 = \frac{s_2^2}{I(J-1)}$$

$$\hat{\sigma}_A^2 = \frac{s_1^2}{I(J-1)} - \frac{s_2^2}{IJ(J-1)}$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\hat{\sigma}_A^2}{I} + \frac{\hat{\sigma}_E^2}{IJ}$$

$y_{ij}$  = Meßwert

$\mu$  = wahrer Wert

$A_i$  = Fehler der Proben-  
behandlung (Trennung)

$E_{ij}$  = Meßfehler (Polarographie)

I = Anzahl der Proben

J = Anzahl der Messungen je  
Probe

$\hat{\sigma}_E^2$  = Varianz der Messung  
(Schätzer)

$\hat{\sigma}_A^2$  = Varianz der Trennung  
(Schätzer)

$\hat{\sigma}^2$  = Varianz der gesamten  
Analyse

---

Voraussetzung für die vorstehende Berechnung ist eine Normalverteilung der Werte. Setzt man eine zweiseitige t-Verteilung mit 5% (also 95% Wahrscheinlichkeit) an, erhält man für  $\mu$  folgendes Ergebnis:

$$\mu = 7,613 \cdot 10^{-7} \text{ M} \pm 0,296 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

Aus der Einwaage von Mexiletin berechnet sich ein theoretischer Wert von  $7,992 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  und damit eine Wiederfindungsrate von  $95,3\% \pm 3,7\%$ .

Damit ergibt sich für die indirekte polarographische Bestimmung des Antiarrhythmikums Mexiletin ein systematischer Fehler von 4,7 %, der hauptsächlich auf die dünnschichtchromatographische Abtrennung des Derivats zurückzuführen ist. Die Wiederfindungsrate liegt im Bereich vergleichbarer quantitativer polarographischer Bestimmungen nach vorheriger Umsetzung. Tammilehto und Perälä fanden z. B. bei der Bestimmung der Konservierungsmittel vom Typ der 4-Hydroxybenzoesäureester über ihre 3-Nitro-Derivate Abweichungen von +5,0 bis -3,5%<sup>76</sup>. Somit liegt das von mir entwickelte Verfahren zur polarographischen Bestimmung therapeutisch genutzter Amine nach Derivatisierung im Rahmen der allgemein akzeptierten Fehlergrenzen.



### 3.5 Weitere Anwendungen für Derivatisierungen mit 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid

In der Literatur sind zur Erfassung schwach UV-aktiver Substanzen bei der HPLC Derivatisierungen mit 4-Nitro- oder 3,5-Dinitrobenzoylchlorid beschrieben worden. So lassen sich Herzglykoside wie Digitoxin und Digitoxigenin durch einen großen Überschuß des Säurechlorids (ca. 400%) quantitativ derivatisieren. Alle Hydroxylgruppen mit Ausnahme der 14C-OH-Gruppe werden hier verestert. Die stark chromophore Dinitrobenzoylgruppe bewirkt eine starke Erhöhung der UV-Absorption gegenüber den Ausgangssubstanzen, wodurch sich die Erfassungsgrenze erweitert. Im Fall der Herzglykoside konnte sie auf 0,6 ng<sup>77</sup> gesenkt werden. Außerdem bietet diese Derivatisierung die Möglichkeit, einen elektrochemischen Detektor einzusetzen. Die beiden Nitrogruppen werden an einer Glas-Kohlenstoff-Elektrode (glassy carbon) reduziert, vermutlich bis zur Hydroxylaminstufe, allerdings machen die Autoren hierzu keine näheren Angaben. Die Nachweisgrenze von Digitoxin wurde auf 0,39 ng<sup>78</sup> gesenkt.

Arzneistoff	Molare Absorption $\epsilon$ der Ausgangsverbindung	Molare Absorption $\epsilon$ des 3,5-Dinitrobenzoesäureamids
Baclofen	174 (258 nm, MeOH)	11.062 (258 nm, MeOH)
	228 (266 nm, MeOH)	7.540 (266 nm, MeOH)
	3.460 (220 nm, MeOH)	30.183 (220 nm, MeOH)
Desipramin	8.965 (250 nm, MeOH) <sup>79</sup>	20.464 (250 nm, MeOH)
Fenfluramin	543 (264 nm, MeOH)	8.912 (264 nm, MeOH)
Maprotilin	2.535 (230 nm, MeOH)	32.395 (230 nm, MeOH)
Metoclopramid	14.698 (273 nm, MeOH)	14.742 (273 nm, MeOH)
Mexiletin	239 (264 nm, MeOH) <sup>80</sup>	8.796 (264 nm, MeOH)
Prilocain	6386 (230 nm, MeOH)	26.384 (230 nm, MeOH)

Tab. 18: Vergleich der Molaren Absorptionskoeffizienten der Modellsubstanzen und ihrer 3,5-Dinitrobenzoesäurederivate

---

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse dürfte DNBA ein vorteilhafter Ersatz für das 3,5-Dinitrobenzoylchlorid als Derivatisierungsreagenz sein. Dies zeigt deutlich ein Vergleich der Molaren Absorptionskoeffizienten (siehe Tab. 18). Die Erhöhung fällt um so stärker aus, je geringer die Absorption der Ausgangsverbindung war. Für das zentrale Muskelrelaxans Baclofen ergibt sich sogar ein Faktor von 50.

---

---

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Analytische Methoden

#### 4.1.1 Elektrochemische Methoden

##### 4.1.1.1 Polarographie (DC<sub>T</sub>, DPP)

Für die polarographischen Untersuchungen wurde ein Polarograph der Firma Metrohm AG (Herisau/CH), Modell VA Processor 695 mit VA Stand 696 verwendet. Als Arbeitselektrode diente eine Quecksilbertropfelektrode der gleichen Firma. Die sogenannte Multi-Mode-Elektrode wird pneumatisch mit Stickstoff gesteuert. Sie erlaubt das Arbeiten mit drei verschiedenen Elektrodentypen (DME, HMDE, SMDE). Der Stickstoffdruck wurde mit 1 bar konstant gehalten. Als Füllung der Elektrode diente hochreines Quecksilber für die Polarographie der Firma Merck/Darmstadt. Sämtlich Polarogramme wurden gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (3 M-KCl als Elektrolyt) aufgenommen. Zur Kompensierung des durch den Ohmschen Widerstand der Analysenlösung entstehenden Spannungsabfalls wurde eine Platinelektrode als Hilfselektrode benutzt.

Bei der Aufnahme der Gleichstrom-Polarogramme wurde mit der Tastpolarographie gearbeitet (DC<sub>T</sub>). Hierbei erfolgt die Strommessung in den letzten 0,2 s des Tropfenlebens.

Bei der Differenzpuls polarographie (DPP) wurde eine stufenförmig ansteigende Spannung 20 ms vor Abschlagen des Tropfens mit einem Spannungsimpuls von -30 mV überlagert. Die Strommessung erfolgte kurz vor Anlegen des Pulses sowie am Ende des Pulses, aufgezeichnet wird die Differenz.

Die Entfernung des Sauerstoffs erfolgte durch 5 min Begasung der untersuchten Lösungen mit Stickstoff der Reinheitsklasse 5.0 der Firma Linde/Leuna.

Soweit nicht anders angegeben, wurden die polarographischen Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Für spezielle Untersuchungen, z.B. die Bestimmung der Temperaturkoeffizienten, war es erforderlich, die Proben in

doppelwandigen Polarographiegefäßen zu thermostatieren. Hierzu diente ein Thermostat M3 der Firma Lauda/Königshofen.

Die verwendeten Puffer wurden jeweils frisch hergestellt. In der Regel wurde mit Britton-Robinson-Puffern gearbeitet, die je nach pH-Wert wechselnde Mengen Borsäure, Phosphorsäure, Essigsäure und Natronlauge enthielten. Alle Chemikalien besaßen mindestens die Reinheit p.a.. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter 525 der Firma WTW/Weilheim und einer Einstabmeßkette STX-70 (WTW/Weilheim) eingestellt. Die Kalibrierung des pH-Meters erfolgte mit handelsüblichen DIN-Standard-Puffern.

#### 4.1.1.2 Coulometrie bei kontrolliertem Potential

Für die coulometrischen Untersuchungen wurde ein Potentiostat Wenking Modell 70 HV 1 (Fa. G. Bank Electronic/Göttingen) in Verbindung mit einem Integrator Modell SSI 70 eingesetzt. Als großflächige Kathode diente gerührtes Bodenquecksilber ( $\varnothing$  5 cm; 10 ml), als Gegen- bzw. Bezugselektrode eine Ag/AgCl-Elektrode (3M-KCl) und als Anode ein Graphitstab in 3M-KCl. Die Graphitelektrode war durch ein mit Agar-Gel (3% in 3M-KCl) überschichtetes Sinterglas-Diaphragma vom Kathodenraum getrennt.

Die coulometrischen Messungen erfolgten unter Stickstoffbegasung in 0,1 M-HCl (pH 1) oder in BRP (pH 2 bzw. pH 7) unter Zusatz von 50% Methanol.

### 4.1.2 Chromatographische Methoden

#### 4.1.2.1 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtete DC-Alufolien der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Die Fließmittel sind jeweils bei der Anwendung angegeben. Die Untersuchungen erfolgten stets mit Kammersättigung. Detektiert wurde unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm (DESAGA/Heidelberg).

#### 4.1.2.2 HPLC

Die HPLC-Messungen wurden mit einer Anlage der Firma Shimadzu (Kyoto/Japan) mit den Pumpen LC 8A, der Steuereinheit SCL-6B, einem Autoinjektor SIL-6B und dem UV-Detektor SPD-7A durchgeführt. Als Säulen kamen LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm, 100  $\mu\text{m}$ ) bzw. LiChrospher 60 RP-select B (250 x 4 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) zum Einsatz. Das Fließmittel, die Flußrate und die Detektionswellenlänge wurden nach den jeweiligen Erfordernissen ausgewählt.

### 4.1.3 Spektroskopische Methoden

#### 4.1.3.1 IR-Spektroskopie

Für die Registrierung der IR-Spektren im Wellenzahlenbereich von 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  wurde ein Magna-IR<sup>®</sup> Spektrometer 550 der Firma Nicolet (Madison / USA) benutzt. Es wurde ein Preßling aus ca. 1mg Substanz und 150 mg getrocknetem KBr (Suprapur, Merck/Darmstadt) angefertigt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem zugehörigen Programm Magna-IR.

#### 4.1.3.2 UV/VIS-Spektroskopie

Die Absorptionskoeffizienten der 3,5-Dinitrobenzoesäureamide sowie die optimalen Wellenlängen für die HPLC-UV-Detektion wurden den UV-Spektren der entsprechenden Substanzen entnommen. Für die Messungen kam ein UV/VIS-DU-640 Spektrophotometer (Beckman Instruments / USA) zum Einsatz. Die im Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  M bis  $10^{-5}$  M im angegebenen Lösungsmittel gelösten Substanzen wurden in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm vermessen.

#### 4.1.3.3 Massenspektroskopie

Die Spektren wurden mit einem Tripel-Quadrupol Massenspektrometer VGQuadro der Firma Fisons Instruments (Mainz-Kastel) aufgenommen. Das Gerät arbeitet mit einem Elektrospray.

#### 4.1.4 Gehaltsbestimmung von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid

Ungefähr 50 mg Anhydrid werden in 25,0 ml Acetonitril gelöst. Dann werden 5,0 ml abgenommen, mit 20 µl Pyridin und 45 µl Piperidin versetzt und etwa 15 min unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur gehalten. Man setzt 1,0 ml internen Standard (Dimethylaminobenzaldehyd  $5 \cdot 10^{-4}$  M) zu und füllt auf 100,0 ml mit Acetonitril/H<sub>2</sub>O (1+1) auf. 10 µl dieser Flüssigkeit werden zur Gehaltsbestimmung in den Chromatographen eingespritzt. Als Säule dient eine LiChrospher<sup>®</sup> RP18 (250 x 4 mm, 100 µm) 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, und detektiert wird bei einer Wellenlänge von 237 nm.

#### 4.1.5 Bestimmung der Umsetzungsrate und -geschwindigkeit

Die bei den nachfolgend beschriebenen Reaktionen verwendeten Chemikalien entsprachen mindestens der Qualität p.a., das Acetonitril hatte eine HPLC-Qualität mit einem Wassergehalt <0,01%. Die verwendeten Reaktionsgefäße waren trocken.

5,0 ml einer  $1 \cdot 10^{-3}$  M-Lösung des zu untersuchenden Amins in Acetonitril werden zusammen mit 43,0 ml Acetonitril unter Rühren auf Untersuchungstemperatur thermostatiert. Je nach Untersuchungsaufgabe werden 0-60 µl Pyridin-Lösung (10% in Acetonitril) und 0-30 µl einer DMAP-Lösung (202 mg/10 ml Acetonitril) oder 0-42 µl einer PPY-Lösung (455 mg/25 ml Acetonitril) zugesetzt. Die Reaktion beginnt mit Zugabe von 2 ml DNBA-Lösung ( $5 \cdot 10^{-3}$  M in Acetonitril). Nach 0,5 min bis 30 min werden Proben genommen. Hierzu gibt man 5,0 ml des Reaktionsgemisches in einen 10,0 ml Maßkolben, der 2,5 ml ultrareines Wasser enthält. Wenn das gesamte Anhydrid hydrolysiert ist, etwa nach 15 min, füllt man mit Fließmittel auf und spritzt dann 50 µl in die HPLC-Anlage ein.

Die HPLC-Messungen wurden mit den unter 4.1.2.2 beschriebenen Geräten durchgeführt. Für die einzelnen Substanzen wird das System wie folgt modifiziert:

Für die Bestimmung der Umsatzrate von Mexiletin dient als Säule eine LiChrospher<sup>®</sup> RP18 (250 x 4 mm, 100 µm) der Firma Merck/Darmstadt. Das Fließmittel besteht aus einer Mischung von Methanol (Ultra Gradient HPLC Grade) (Baker/Holland) und 0,04 M Acetatpuffer, pH 7,0; 70:30 (v/v). Die Flußrate beträgt 0,7 ml/min, und detektiert wird bei einer Wellenlänge von 215 nm.

Derivatisiertes Procainamid und Metoclopramid sowie ihre Ausgangsverbindungen werden mit einer LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B (250 x 4 mm, 5 µm) der Firma Merck/Darmstadt bestimmt. Das Fließmittel besteht aus einer Mischung von Methanol (Ultra Gradient HPLC Grade) (Baker/Holland) und 0,05M Phosphatpuffer, pH 4,1; 50:50 (v/v). Die Flußrate beträgt 0,9 ml/min, detektiert wird bei einer Wellenlänge von 273 nm.

Analog dient für die Bestimmung der Umsatzrate von Desipramin und Maprotilin als Säule eine LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B (250 x 4 mm, 5 µm) der Firma Merck/Darmstadt. Das Fließmittel besteht aus einer Mischung von Acetonitril (Ultra Gradient HPLC Grade) (Baker/Holland) und 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0; 60:40 (v/v). Die Flußrate beträgt 1,2 ml/min, detektiert wird bei einer Wellenlänge von 215 nm.

#### **4.1.6 Indirekte polarographische Gehaltsbestimmung von Amininen nach Trennung der Reaktanten durch Ionenaustauschchromatographie**

20 ml einer  $1 \cdot 10^{-3}$  M-Lösung eines primären oder sekundärenamins in Acetonitril werden unter Rühren mit 16,3 mg ( $4 \cdot 10^{-5}$  mol) 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid versetzt. Nach Zusatz von 7 µl ( $8 \cdot 10^{-5}$  mol) Pyridin und 120 µl ( $2 \cdot 10^{-5}$  mol) einer Dimethylaminopyridin-Lösung (0,02% in Acetonitril) läßt man bei Raumtemperatur 15 min rühren. Nach Zusatz von 10 ml Wasser wird weitere 5 min gerührt und dann die Mischung mit Methanol/Wasser (1+1, v/v) auf 100,0 ml aufgefüllt.

Die Abtrennung der 3,5-Dinitrobenzoesäure erfolgt an einem stark basischen Anionenaustauscher mit 0,6 - 0,75 mm Korngröße (Amberlite<sup>®</sup> IRA-402, Cl<sup>-</sup>-Form Merck/Darmstadt). Der Ionenaustauscher wird in eine Chromatographie-

säule (l = 10 cm, ID = 1,6 cm) gefüllt und mit 50 ml Methanol/Wasser (1+1, v/v) gespült. Es werden 5,0 ml der Reaktionslösung auf den Austauscher gegeben und mit Methanol/Wasser (1:1, v/v) auf 50,0 ml nachgespült. Die Flußrate soll bei ungefähr 3 ml/min liegen.

2,0 ml dieser Lösung werden nach Zugabe von 3,0 ml Methanol und 5,0 ml BRP polarographisch im DPP-Modus vermessen (siehe 4.1.1.1). Die Konzentration wird über eine Eichgerade des Amids berechnet. Zur Auswertung wird Peak 2 herangezogen.

#### **4.1.7 Indirekte polarographische Gehaltsbestimmung von Aminen nach Trennung der Reaktanten durch Dünnschichtchromatographie**

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  $\mu$ l ( $8 \cdot 10^{-5}$  mol) Pyridin und 120  $\mu$ 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 mit demineralisiertem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Es werden je 10,0  $\mu$ l (Spritze 10  $\mu$ l, Hamilton, Bonaduz/CH) dieser Lösung auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (Folie Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck/Darmstadt) aufgetragen. Als mobile Phase dient ein Gemisch von NH<sub>3</sub> 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 Polarographiegefäß übergeführt. Nach Zusatz von 5 ml Methanol wird die Substanz im Ultraschallbad 30 s extrahiert. Dann werden 5 ml BRP (pH 7,0) zugesetzt und der Depolarisator im Bereich von 0 bis 700 mV im DPP-Modus (siehe 4.1.1.1) bestimmt. Die Konzentrationsberechnung erfolgt über eine Kalibriergerade des Amids. Zur Auswertung wird Peak 2 herangezogen.



## 4.2 Präparativer Teil

### 4.2.1 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid (Dicyclohexylcarbodiimid-Methode)

2,0 g (9,4 mmol) 3,5-Dinitrobenzoesäure und 0,98 g (4,7 mmol) DCC werden in 100 ml getrocknetem Acetonitril gelöst. Man rührt 24 h bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß. Dann wird das Solvens i. Vak. abgezogen.

Zur Entfernung des Nebenproduktes (Dicyclohexylharnstoff) suspendiert man den verbleibenden Niederschlag in kaltem Methanol. Das unlösliche Anhydrid wird nach dem Absaugen und Trocknen aus Acetonitril umkristallisiert. Es ergeben sich weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 220-223°C (76% d. Th.).

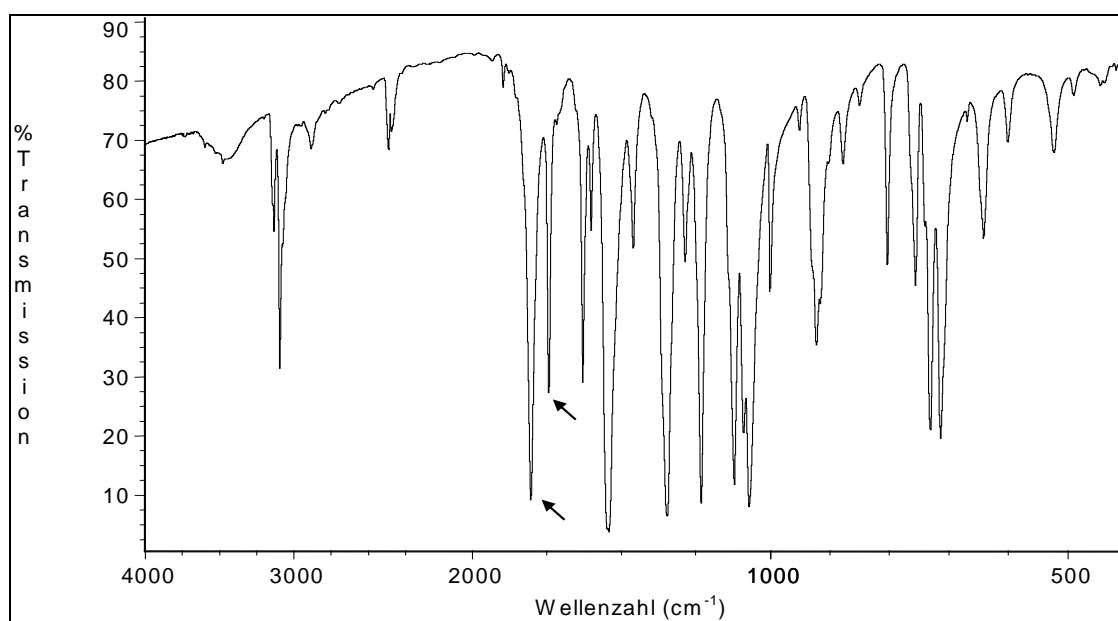
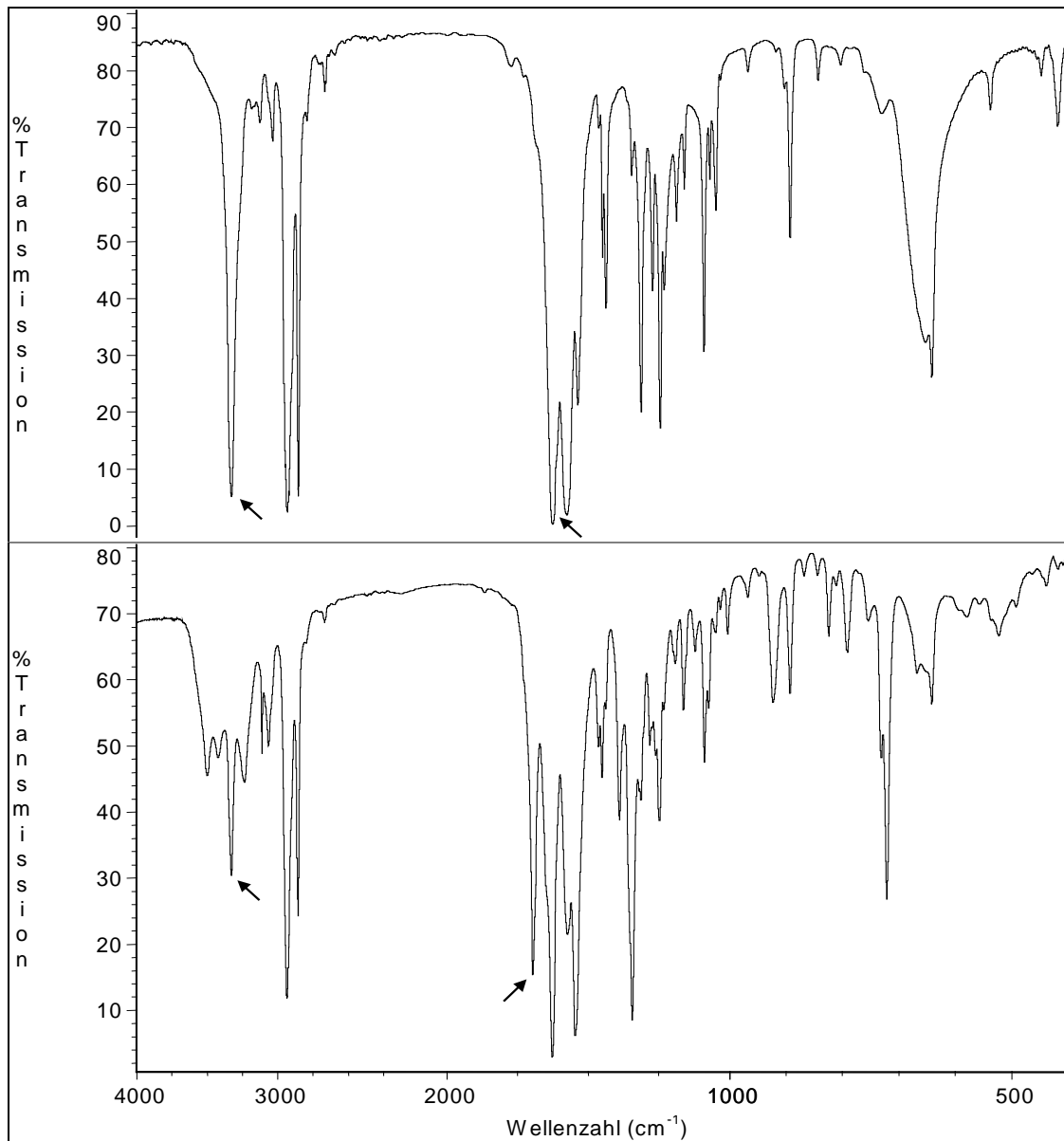


Abb. 24: IR-Spektrum von DNBA

Das IR-Spektrum entspricht dem in der Literatur angegebenen Spektrum<sup>44</sup>. Auffällig sind die beiden C=O Valenzschwingungen bei 1803 cm<sup>-1</sup> bzw. 1743 cm<sup>-1</sup> (siehe Abb. 24).

Zur Isolierung der in Methanol löslichen Nebenprodukte wird die methanolische Lösung i. Vak. eingedampft. Man nimmt den Rückstand mit Dichlormethan auf, als unlöslich bleibt der Dicyclohexylharnstoff zurück. Nach Umkristallisieren aus Methanol schmilzt dieser bei 230-232°C (Lit.<sup>81</sup>: Schmp. 230-234 °C). Das IR-

Spektrum (siehe Abb. 25 oben) zeigt eine stark ausgebildete N-H-Valenzschwingung bei  $3326\text{ cm}^{-1}$  und eine C=O-Valenzschwingung bei  $1625\text{ cm}^{-1}$ .



**Abb. 25:** IR-Spektren des 1,3-Dicyclohexylharnstoffs (oben) und des 3,5-Dinitrobenzoyldicyclohexylharnstoffs (unten)

Um das zweite Nebenprodukt, den Acylharnstoff neben der 3,5-Dinitrobenzoesäure zu erfassen, wird die Dichlormethanphase 2 mal mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (8%, m/v) ausgeschüttelt. Nach dem Abziehen des  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  erhält man weiße Kristalle (Schmp.  $270\text{-}271^\circ\text{C}$ ), deren Massenspektrum den Molpeak des 3,5-Dinitrobenzoyldicyclohexylharnstoffs zeigt. Das IR-Spektrum weist gegenüber dem des

1,3-Dicyclohexylharnstoffs eine zusätzliche C=O-Bande bei  $1696\text{ cm}^{-1}$  auf. Die N-H-Valenz-Schwingung bei  $3326\text{ cm}^{-1}$  tritt mit wesentlich geringerer Intensität auf, entsprechend einem einfach acylierten Harnstoff (Abb. 25 unten).

**MS (ES-):**  $m/z$  (%) = 417 [(M-H)<sup>-</sup> 88], 292 [56]

#### **4.2.2 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid (nach Oelschläger 1984<sup>44</sup>)**

23,0 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (99 mmol) werden in 150 ml Acetonitril gelöst. Unter Eiskühlung und ständigem Rühren setzt man tropfenweise 8 ml (7,8g, 99 mmol) Pyridin zu. Eine weiße Trübung zeigt die Bildung der N-Acyl-Pyridinium-Verbindung an. Nach Zusatz von 89  $\mu\text{l}$  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  $220\text{-}223^\circ\text{C}$  (75% d. Th.).

#### **4.2.3 N-[2-(Diethylamino)ethyl]-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)-amino]benzamid (DNB-Procaïnamid)**

200 mg (0,74 mmol) Procaïnamid-HCl werden in 1 ml Wasser gelöst und mit 50 ml Dioxan versetzt. Nach Zugabe von 530 mg (1,3 mmol) DNBA und 100  $\mu\text{l}$  (1,3 mmol) Pyridin wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h ist die Reaktion beendet (DC-System Kieselgel, FM  $\text{CH}_2\text{Cl}_2+\text{MeOH}+\text{Dioxan}+\text{NH}_3$  25%, 90+14+10+2, v/v). Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgezogen und der Rückstand in  $\text{CHCl}_3$  aufgenommen. Es wird 3x mit 0,1M-NaOH und 1x mit  $\text{H}_2\text{O}$  ausgeschüttelt bis keine 3,5-Dinitrobenzoesäure und Pyridin mehr nachweisbar sind. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels werden die gelben Kristalle aus  $\text{CHCl}_3$  umkristallisiert. Sie zeigen dc-rein einen Schmp. von  $191\text{-}192^\circ\text{C}$  (Ausbeute 58% d. Th.).

**MS (ES-):**  $m/z$  (%) = 857 [(2M-H)<sup>-</sup>, 68], 428 [(M-H)<sup>-</sup>, 100]

EA: ber.: C 55,9; H 5,40; N 16,3; O 22,3  
gef.: C 55,8; H 5,48; N 16,4; O 22,3

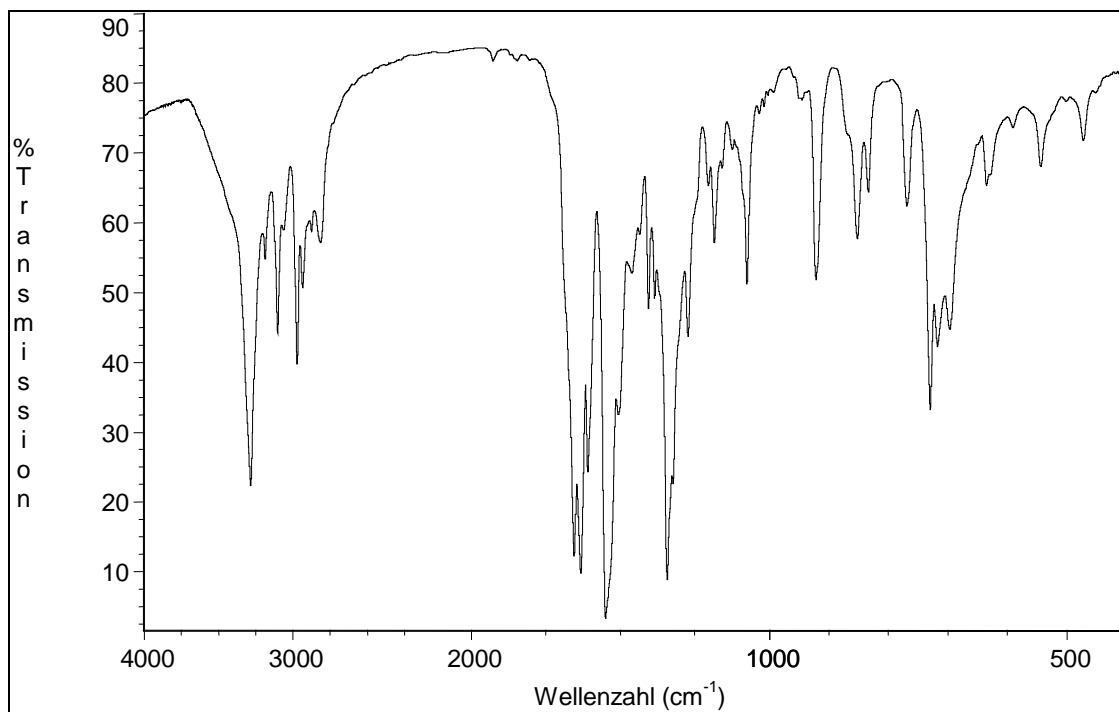


Abb. 26: IR-Spektrum von *N*-[2-(Diethylamino)ethyl]-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)-amino]benzamid

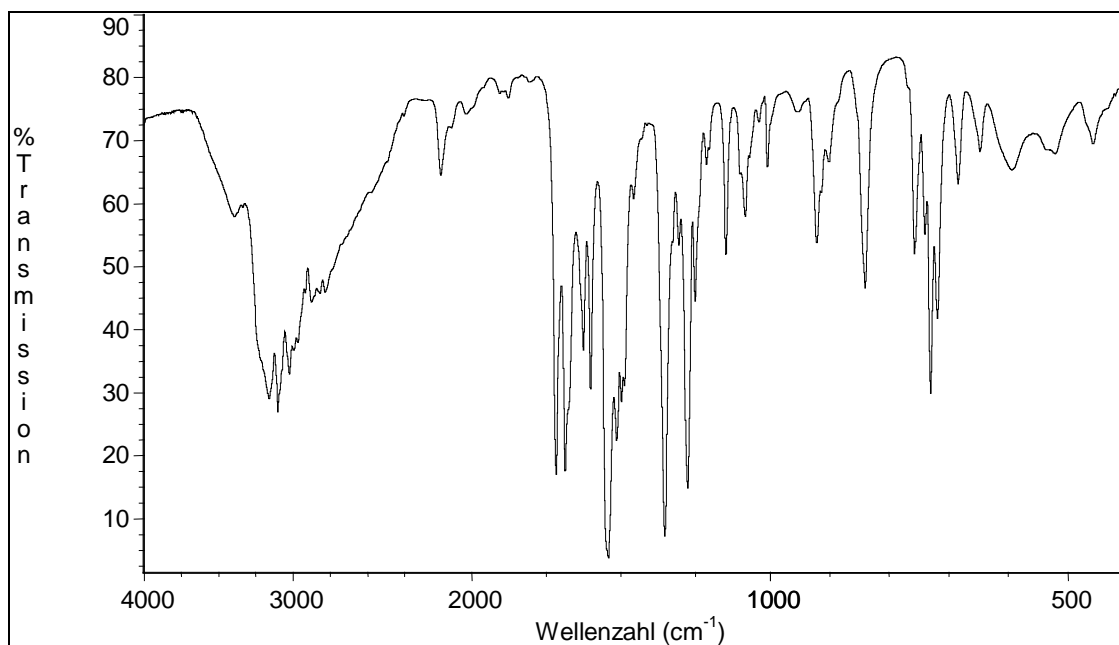
#### 4.2.4 *N*'-(3,5-Dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazid (DNB-Isoniazid)

200 mg (1,45 mmol) Isonicotinsäurehydrazid werden in 40 ml Dioxan gelöst, nach Zugabe von 670 mg (2,9 mmol) 3,5-Dinitrobenzoylchlorid wird 60 min bei Raumtemperatur gerührt (DC-System Kieselgel, FM CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>+MeOH, 90+10, v/v). Aufgrund der schlechten Löslichkeit von DNBA wurde bei dieser Synthese das Säurechlorid verwendet. Der weiße Niederschlag wird abgesaugt, mit Dioxan gewaschen und aus Methanol umkristallisiert (Ausbeute 21% d. Th.). Die Kristalle erwiesen sich als das Hydrochlorid der Verbindung und schmelzen unter Zersetzung bei 287 °C. Die Base erhält man durch Alkalisieren der wässrigen Lösung des Hydrochlorids. Die erhaltenen braunen Kristalle schmelzen nach Umkristallisieren in Methanol unter Zersetzung bei 273 °C.

**MS (ES+):**  $m/z$  (%) = 332 [(M+H)<sup>+</sup>, 100], 315 [13], 194 [19], 146 [50]

**EA:** ber.: C 47,1; H 2,74; N 21,1; O 29,0

gef.: C 46,9; H 2,91; N 21,3; O 28,8



**Abb. 27:** IR-Spektrum von *N'*-(3,5-Dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazid (DNB-Isoniazid)

#### 4.2.5 *N*-[3-(10,11-Dihydro-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepin-5-yl)propyl]-*N*-methyl-3,5-dinitrobenzamid (DNB-Desipramin)

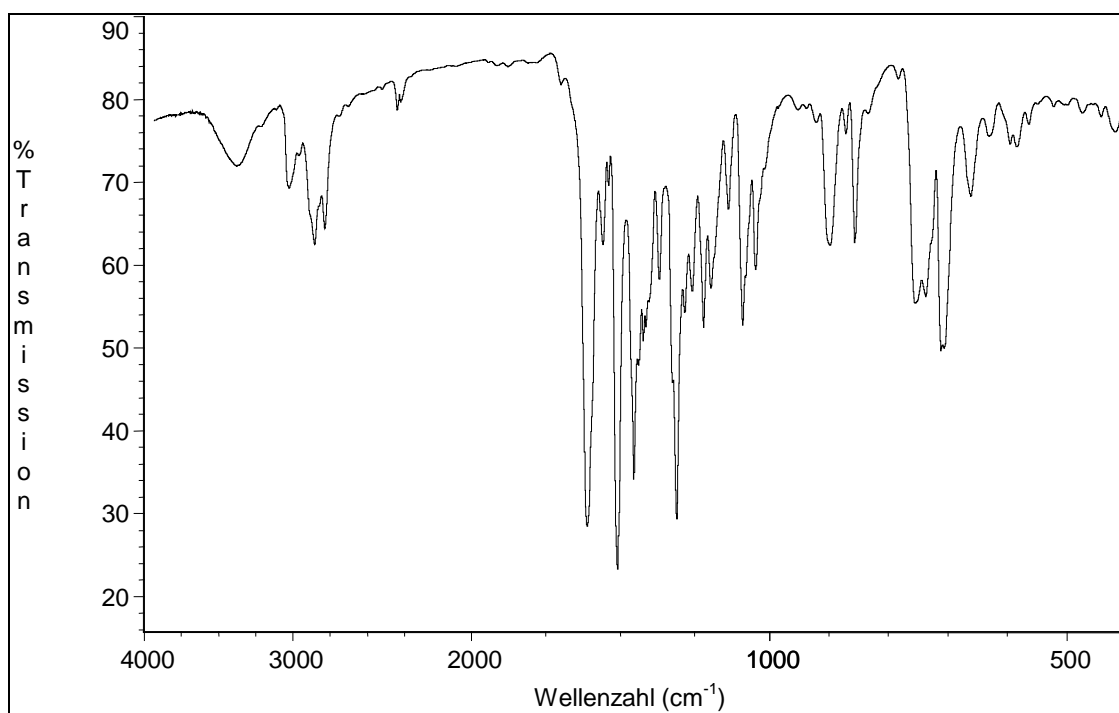
75 mg (0,25 mmol) Desipramin-HCl werden in 20 ml Wasser gelöst und mit 0,1M-NaOH bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Die ausfallende Base wird mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Der abgetrennten organischen Phase werden 120 mg (0,52 mmol) 3,5-Dinitrobenzoylchlorid zugesetzt und 120 min bei Raumtemperatur gerührt (DC-System Kieselgel, FM Toluol+Eisessig+H<sub>2</sub>O, 10+10+1, v/v). Aufgrund der schlechten Löslichkeit von DNBA wurde bei dieser Synthese das Säurechlorid verwendet; im Mikromaßstab durchgeführte Synthesen mit DNBA führten aber zum gleichen Ergebnis. Die Lösung wird 2x mit 0,1 M-NaOH ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Absaugen des

Lösungsmittels i. Vak. und Umkristallisieren ( $C_2H_5OH/H_2O$  1+1 (v/v)) werden dc-reine orange Kristalle vom Schmp.  $67-68^\circ C$  erhalten (Ausbeute 83% d. Th.).

**MS** (ES+):  $m/z$  (%) = 461 [(M+H)<sup>+</sup>, 100], 483 [(M+Na)<sup>+</sup>, 65], 943 [(2M+Na)<sup>+</sup>, 32], 304 [37]

**EA**: ber.: C 65,2; H 5,25; N 12,2; O 17,3

gef.: C 65,3; H 5,25; N 12,3; O 17,0



**Abb. 28:** IR-Spektrum von *N*-[3-(10,11-Dihydro-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepin-5-yl)propyl]-*N*-methyl-3,5-dinitrobenzamid

#### 4.2.6 (RS)-*N*-{1-[(2-methylphenyl)carbamoyl]ethyl}-3,5-dinitro-*N*-propylbenzamid (DNB-Prilocain)

200 mg (0,78 mmol) Prilocain·HCl werden in 50 ml Acetonitril gelöst. Nach Zusatz von 480 mg (2,0 mmol) 3,5-Dinitrobenzoylchlorid und 230  $\mu$ l (2,8 mmol) Pyridin läßt man 120 min lang rühren (DC-System Kieselgel, FM  $CH_2Cl_2+MeOH$ , 90+10, v/v). Aufgrund der schlechten Löslichkeit von DNBA wurde bei dieser Synthese das Säurechlorid verwendet, im Mikromaßstab durchgeführte Synthesen mit DNBA führten aber zum gleichen Ergebnis. Das Lösungsmittel wird i. Vak.

abgezogen und der Rückstand mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen. Zur Entfernung von 3,5-Dinitrobenzoesäure und Pyridin wird je 2x mit 0,1 M-NaOH und 0,1 M-HCl ausgeschüttelt, dann mit Wasser gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Abziehen des  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kristallisiert die Substanz langsam. Nach Umkristallisieren aus  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (1+1, v/v) schmelzen die erhaltenen dc-reinen gelben Kristalle zwischen  $67\text{-}69^\circ\text{C}$  (Ausbeute 55% d. Th.).

**MS** (ES<sup>+</sup>): m/z (%) = 415 [(M+H)<sup>+</sup>, 79], 437 [(M+Na)<sup>+</sup>, 68], 851 [(2M+Na)<sup>+</sup>, 93], 308 [100]

**EA:** ber.: C 58,0; H 5,35; N 13,5; O 23,2  
gef.: C 57,4; H 4,89; N 13,8; O 23,8

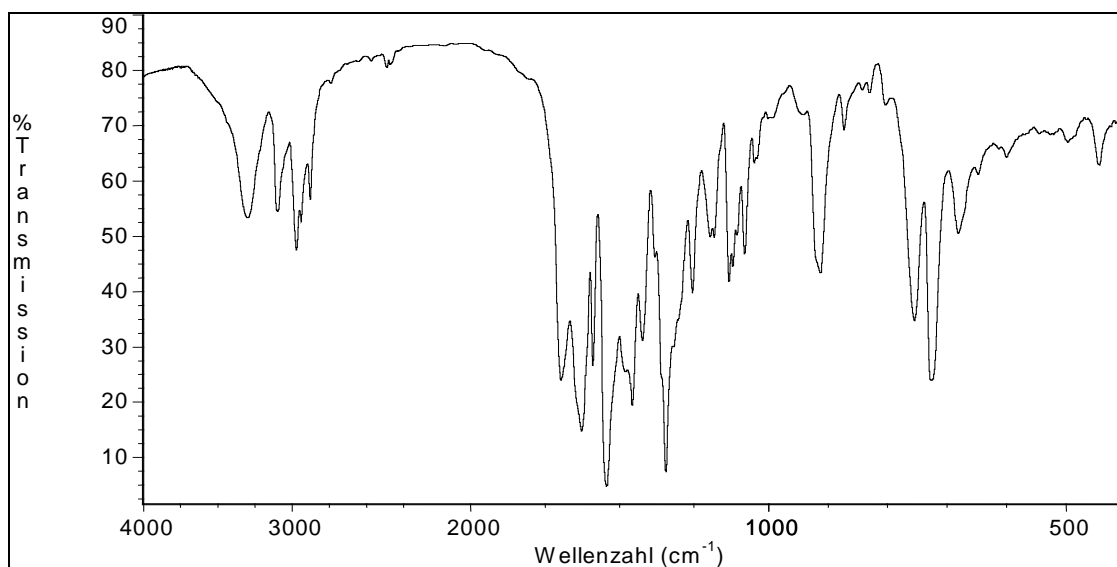


Abb. 29: IR-Spektrum von *(RS)*-*N*-{1-[(2-methylphenyl)carbamoyl]ethyl}-3,5-dinitro-*N*-propylbenzamid

#### 4.2.7 **(*RS*)-3-(4-Chlorphenyl)-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)-amino]butansäure (DNB-Baclofen)**

200 mg (0,93 mmol) Baclofen werden in ca. 50 ml Dioxan suspendiert, nach Zusatz von 450 mg (1,95 mmol) 3,5-Dinitrobenzoylchlorid läßt man 30 min rühren (DC-System Kieselgel, FM Ethylacetat+ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ +MeOH+Eisessig+ $\text{H}_2\text{O}$ , 40+20+20+1+5, v/v). Eine Trübung wird durch Zugabe von 5 ml Wasser beseitigt. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel. Als mobile

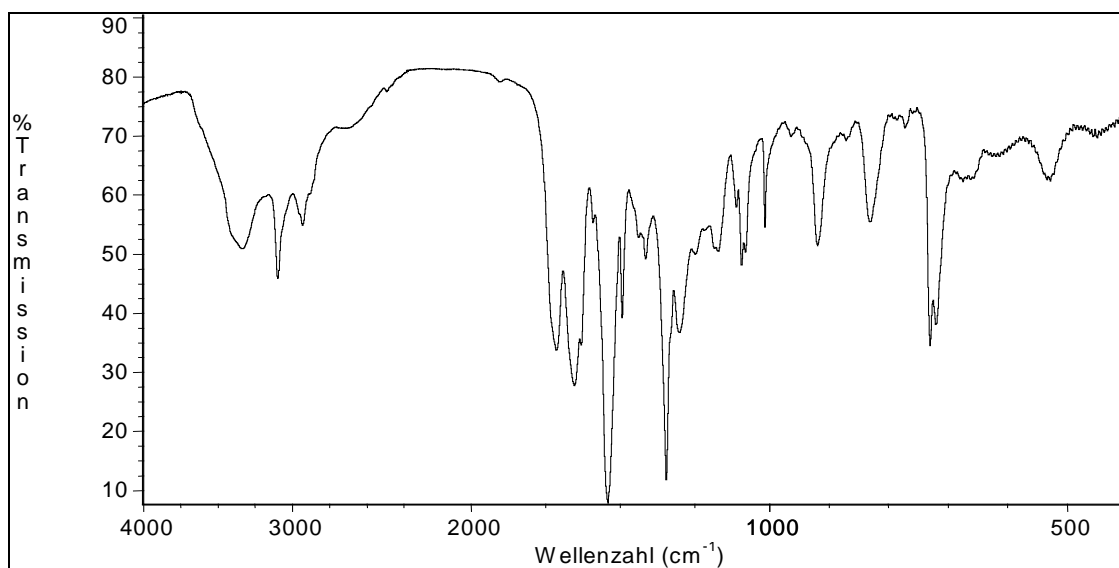
Phase wird Ethylacetat/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O (40+20+20+1+5, v/v) verwendet. Das Derivat fällt in Form weißer Kristalle an, die bei 178-179 °C schmelzen (Ausbeute 52% d. Th.).

**MS (ES+):** m/z (%) = 430 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100], 837 [(2M+Na)<sup>+</sup>, 12], 335 [49]

**MS (ES-):** m/z (%) = 406 [(M-H)<sup>-</sup>, 100], 813 [(2M-H)<sup>-</sup>, 71]

**EA:** ber.: C 50,1; H 3,46; N 10,3; O 27,4; Cl 8,7

gef.: C 50,8; H 3,96; N 10,3; O 27,4 Cl 8,7



**Abb. 30:** IR-Spektrum von *(RS)*-3-(4-Chlorphenyl)-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)amino]-butansäure

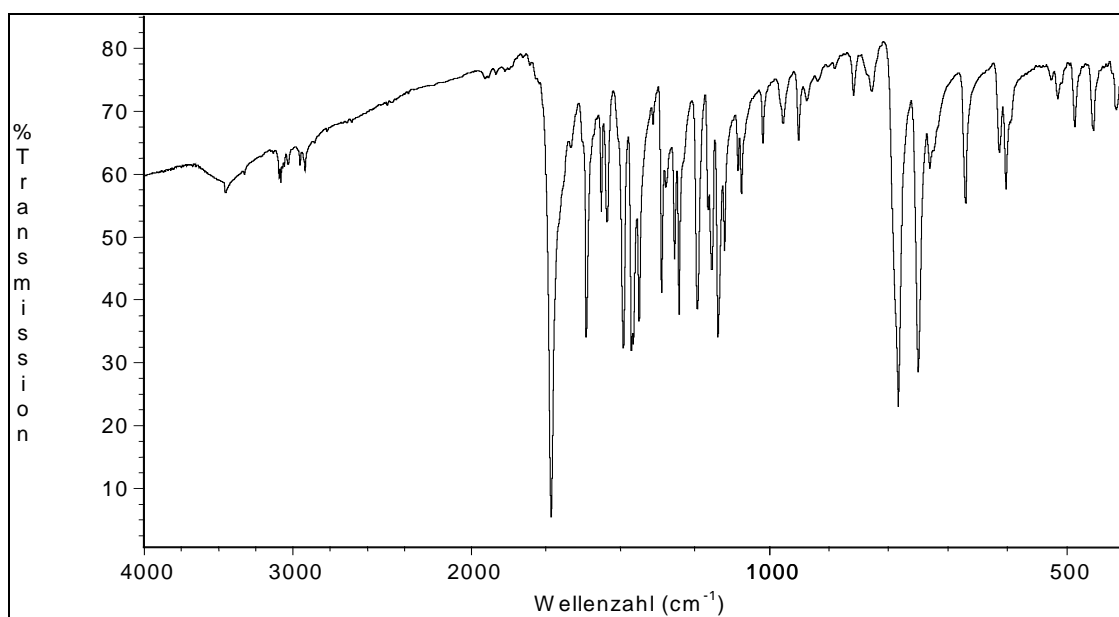
#### 4.2.8 1-(2,6-Dichlorphenyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on

100 mg (0,31 mmol) Diclofenac-Na werden in 40 ml Acetonitril gelöst, mit 250 mg (0,62 mmol) DNBA und 100 µl (1,23 mmol) Pyridin versetzt. Bei Siedetemperatur läßt man 4 h rühren. Der Umsatz ist danach vollständig (Kieselgel, FM CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Eisessig 9+1+0,1, v/v). Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgezogen und der Rückstand mit Dichlormethan aufgenommen. Man schüttelt mit 0,1 M-HCl und danach mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (8%, m/v) aus und trocknet über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels fallen weiße Kristalle an, die bei 124,5 °C schmelzen (Lit.<sup>82, 83</sup>: Schmp. 123-125°C). Das IR-Spektrum weicht in überraschender Weise von den übrigen Amid- in charakteristischer Form ab. Die



Molekulargewichtsbestimmung (MS) deutet in Verbindung mit dem Schmelzpunkt darauf hin, daß das Molekül kein 3,5-Dinitrobenzoesäurederivat gebildet hat, sondern cyclisierte. Es handelt sich eindeutig um das in der Literatur<sup>82, 83</sup> beschriebene 1-(2,6-Dichlorphenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (Ausbeute 89% d. Th.).

**MS** (ES+):  $m/z$  (%) = 278 [(M+H)<sup>+</sup>, 18], 300 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100], 577 [(2M+Na)<sup>+</sup>, 71]



**Abb. 31:** IR-Spektrum von 1-(2,6-Dichlorphenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on

#### **4.2.9 5-Chlor-N-[2-(diethylamino)ethyl]-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)amino]-2-methoxybenzamid(DNB-Metoclopramid)**

200 mg (0,56 mmol) Metoclopramid·HCl·H<sub>2</sub>O werden in 1 ml Wasser gelöst und mit 30 ml Acetonitril versetzt. Nach Zugabe von 350 mg (1,52 mmol) 3,5-Dinitrobenzoylchlorid wird unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach 30 min ist die Reaktion vollständig. (Kieselgel, FM CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Dioxan/NH<sub>3</sub>25%, 90+14+10+2, v/v). Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgezogen und der Rückstand in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen. Es wird 2x mit 0,1 M-NaOH ausgeschüttelt, bis keine 3,5-Dinitrobenzoesäure mehr nachweisbar ist. Nach dem Abziehen des

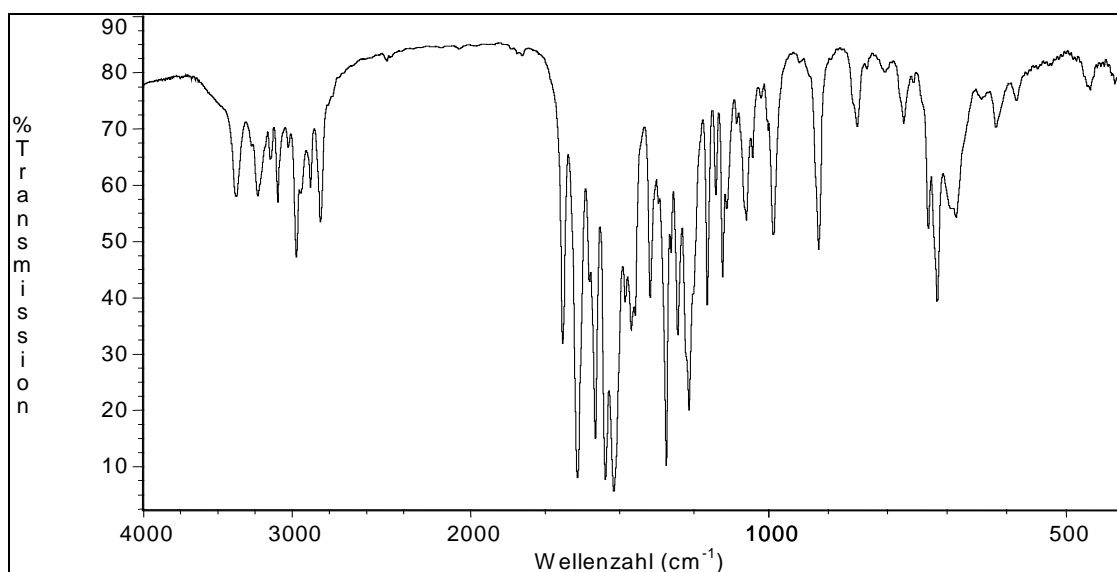
Lösungsmittels werden die gelben Kristalle aus Methanol umkristallisiert. Sie zeigen dc-rein einen Schmelzpunkt von 211,8-213,6°C (Ausbeute 63% d. Th.).

**MS (ES+):** m/z (%) = 494 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

**MS (ES-):** m/z (%) = 492 [(M-H)<sup>-</sup>, 100], 985 [(2M-H)<sup>-</sup>, 13]

**EA:** ber.: C 51,1; H 4,90; N 14,2; O 22,7; Cl 7,2

gef.: C 50,8; H 4,89; N 14,2; O 22,8; Cl 7,3



**Abb. 32:** IR-Spektrum von 5-Chlor-N-[2-(diethylamino)ethyl]-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)amino]-2-methoxybenzamid

#### 4.2.10 (RS)-N-[2-(2,6-dimethylphenoxy)-1-methylethyl]-3,5-dinitrobenzamid (DNB-Mexiletin)

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von DNBA wurde bei dieser Synthese das Säurechlorid verwendet, im Mikromaßstab durchgeführte Synthesen mit DNBA führten aber zum gleichen Ergebnis. 200 mg (0,95 mmol) Mexiletin HCl werden in 50 ml Acetonitril suspendiert und mit 660 mg (2,9 mmol) 3,5-Dinitrobenzoylchlorid und 235 µl (2,9 mmol) Pyridin und 118 mg (0,95 mmol) DMAP versetzt. Die Umsetzung ist bei Raumtemperatur nach 3 Stunden vollständig, durch Zugabe von 5 ml Wasser wird der Überschuß an Säurechlorid zersetzt (DC-System Kieselgel, FM CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>+MeOH+NH<sub>3</sub>25%, 85+14+1, v/v). Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgezogen und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Man

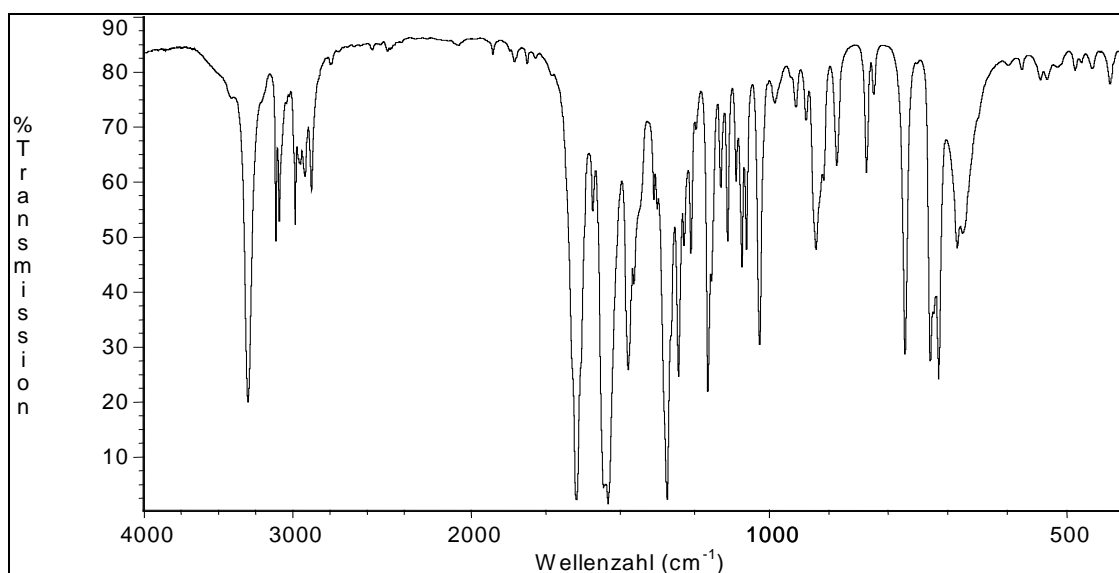
schüttelt je 2 mal mit 0,1 M-HCl und 0,1 M-NaOH aus, um Pyridin, DMAP und 3,5-Dinitrobenzoesäure zu entfernen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels kristallisiert das Amid aus. Die Kristalle haben eine weiße Farbe und schmelzen nach Umkristallisieren aus  $\text{CHCl}_3$  dc-rein bei 182,0-183,5°C (Ausbeute 75% d. Th.).

**MS** (ES+):  $m/z$  (%) = 369 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100], 769 [(2M+Na)<sup>+</sup>, 23], 374 [(M+H)<sup>+</sup>, 21], 304 [32]

**MS** (ES-):  $m/z$  (%) = 372 [(M-H)<sup>-</sup>, 88], 745 [(2M-H)<sup>-</sup>, 100]

**EA**: ber.: C 57,9; H 5,13; N 11,3; O 25,7

gef.: C 57,6; H 5,06; N 11,5; O 25,8



**Abb. 33:** IR-Spektrum von (*RS*)-*N*-[2-(2,6-dimethylphenoxy)-1-methylethyl]-3,5-dinitrobenzamid

#### 4.2.11 *N*-[3-(9,10-Dihydro-9,10-ethanoanthracen-9-yl)propyl]-*N*-methyl-3,5-dinitrobenzamid (DNB-Maprotilin)

100 mg (0,32 mmol) Maprotilin·HCl werden in 100 ml Acetonitril suspendiert und mit 300 mg (0,74 mmol) DNBA sowie 100  $\mu\text{l}$  (1,23 mmol) Pyridin versetzt. Die Umsetzung ist nach 30 Minuten bei Siedehitze vollständig, durch Zugabe von 5 ml Wasser wird der Überschuss an Anhydrid zersetzt (DC-System Kieselgel, FM  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ +MeOH+ $\text{NH}_3$ , 25%, 85+14+1, v/v). Das Lösungsmittel wird i. Vak.

abgezogen und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Man schüttelt je 2 mal mit 0,1 M-HCl und 0,1 M-NaOH aus, um Pyridin und 3,5-Dinitrobenzoesäure zu entfernen und wäscht mit H<sub>2</sub>O. Nach Abdampfen des Lösungsmittels kristallisiert das Amid aus. Die Kristalle haben eine gelblich-weiße Farbe. Sie schmelzen bei 74-76°C (Ausbeute 91% d. Th.).

**MS** (ES<sup>+</sup>): m/z (%) = 472 [(M+H)<sup>+</sup>, 41], 494 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100], 966 [(2M+Na)<sup>+</sup>, 60], 1436 [(3M+Na)<sup>+</sup>, 41]

**EA:** ber.: C 68,6; H 5,34; N 8,9; O 16,9  
gef.: C 68,6; H 4,98; N 8,8; O 17,6

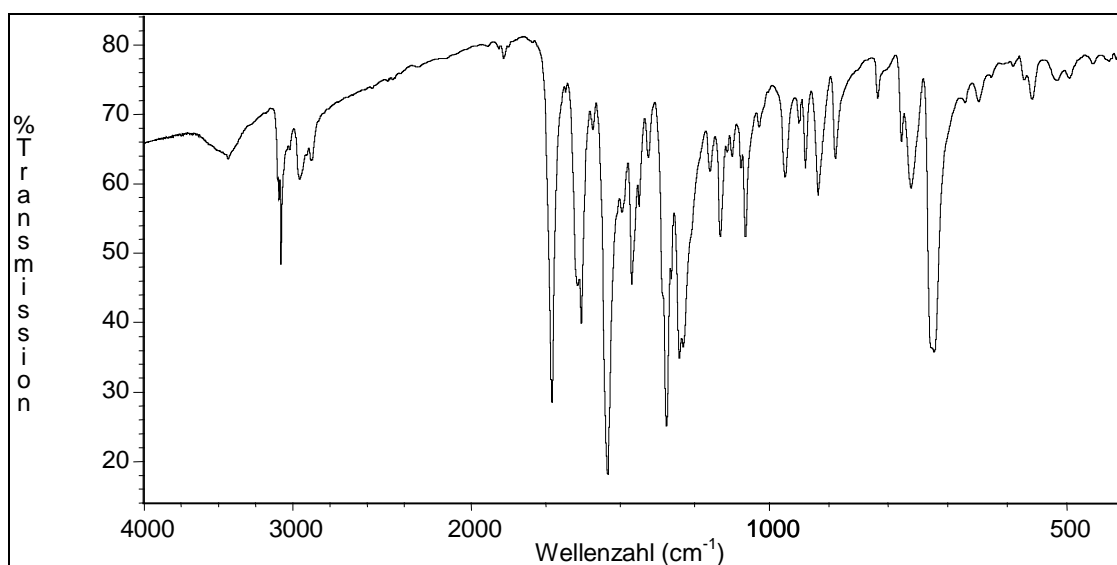


Abb. 34: IR-Spektrum von *N*-[3-(9,10-Dihydro-9,10-ethanoanthracen-9-yl)propyl]-*N*-methyl-3,5-dinitrobenzamid

#### 4.2.12 (RS)-*N*-Ethyl-*N*-{1-methyl-2-[3-(trifluormethyl)-phenyl]ethyl}-3,5-dinitrobenzamid (DNB-Fenfluramin)

Die Synthese erfolgt analog 3,5-Dinitrobenzoylmaprotilin (DC-System Kieselgel, FM CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>+MeOH+NH<sub>3</sub>25%, 85+14+1, v/v). Das Amid kristallisiert in gelbbraunen Kristallen vom Schmelzpunkt 30-40 °C (Ausbeute 85% d. Th.).

**MS (ES<sup>+</sup>):** m/z (%) = 426 [(M+H)<sup>+</sup>, 18], 448 [(M+Na)<sup>+</sup>, 8], 873 [(2M+Na)<sup>+</sup>, 13], 232 [100]

**EA:** ber.: C 53,7; H 4,27; N 9,9; O 18,8; F 13,4  
gef.: C 53,7; H 4,51; N 9,8; O 18,9; Cl 12,8

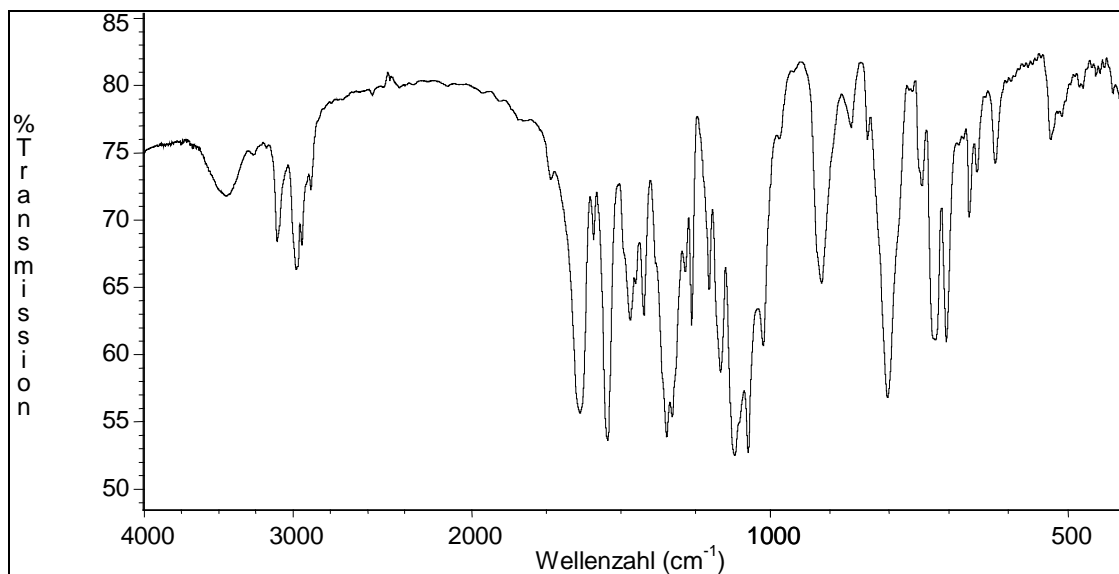


Abb. 35: IR-Spektrum von (*RS*)-*N*-Ethyl-*N*-{1-methyl-2-[3-(trifluormethyl)phenyl]ethyl}-3,5-dinitrobenzamid

#### 4.2.13 1-(3,5-Dinitrobenzoyl)-piperidin

Eine Lösung von 100  $\mu$ l (86 mg, 1 mmol) Piperidin in 100 ml Acetonitril wird mit 550 mg (2,38 mmol) 3,5-Dinitrobenzoylchlorid und 100  $\mu$ l (1,23 mmol) Pyridin versetzt. Die Umsetzung ist nach 30 Minuten bei Siedehitze vollständig, durch Zugabe von 5 ml Wasser wird der Überschuss an Säurechlorid zersetzt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgezogen und der Rückstand mit Dichlormethan aufgenommen. Man schüttelt je 2 mal mit 0,1 M-HCl und 0,1 M-NaOH aus, um Pyridin und 3,5-Dinitrobenzoesäure zu entfernen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels kristallisiert das Amid aus (92% d. Th.). Aus Methanol/Wasser resultieren gelbliche dc-reine Kristalle vom Schmelzpunkt 144°C (Lit. <sup>84</sup>: Schmp. 141°C)

## 5 Zusammenfassung

Im Jahre 1985 führte die Firma Merck/Darmstadt aufgrund der Entwicklungsarbeiten von Prof. Oelschläger das 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid (DNBA) als Reagenz in die Analytik ein. Oelschläger fand einen neuen günstigen Syntheseweg, der die Substanz in guten Ausbeuten lieferte. Bei umfassenden Untersuchungen zur Derivatisierung von Alkoholen und Phenolen ergab sich seinerzeit eine hohe Reaktivität des Reagenzes. Die anfallenden Ester kristallisierten gut, die Ausbeuten schwankten strukturabhängig zwischen 80-90 % d. Th.. Daher bot sich folgerichtig das geruchlose und stabile DNBA als Ersatz des aggressiven 3,5-Dinitrobenzoesäurechlorids an und wurde 1986 in den Deutschen Arzneimittel-Codex (DAC) zur Identifizierung von 1-Propanol aufgenommen. In der Literatur sind weitere, auf diese Weise erhaltene 3,5-Dinitrobenzoesäureester beschrieben. Die Derivate sind an der DME polarographisch aktiv und ermöglichen eine indirekte Bestimmung von ursprünglich polarographisch inaktiven Substanzen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die Derivatisierung von Arzneistoffen mit primären und sekundären Aminogruppen erstmalig mittels DNBA untersucht werden. Hierbei sollten auch die Vorteile, die das Reagenz gegenüber dem entsprechenden Säurechlorid bietet, umfassend abgeklärt werden. Die Bedeutung primärer und sekundärer Amine für die Therapie ist offenkundig, ihre Vertreter finden sich in den Stoffgruppen der Psychopharmaka, Lokalanästhetika, Sympathomimetika, Sympatholytika, Muskelrelaxantien u. a.. Diese Pharmaka sind ausnahmslos polarographisch inaktiv. Daher sollte versucht werden, die Umsetzung mit DNBA quantitativ zu gestalten, um dann das polarographische Verhalten der erhaltenen Derivate an der DME mit dem Ziel zu untersuchen, eine indirekte polarographische Meßmethode zu entwickeln.

Aufbauend auf einem für andere organische Anhydride bekannten Syntheseweg wurde zunächst eine neue Synthese für DNBA entwickelt. Sie geht von der 3,5-Dinitrobenzoesäure aus. Ein Zusatz von DCC führt zu einem Anhydrid vom Schmelzpunkt 220-223°C. Mit einer Ausbeute von 76 % d. Th. ist diese neue Synthese ähnlich effektiv wie die beiden schon bekannten Synthesewege. Als Nebenprodukt wurde der 3,5-Dinitrobenzoylharnstoff identifiziert.

---

Für weitere Untersuchungen war die Entwicklung einer Gehaltsbestimmungsmethode für DNBA zwingend notwendig. Sie konnte auf indirektem Weg durch Umsetzung mit Piperidin und nachfolgender HPLC-Bestimmung des entstandenen Amids verwirklicht werden, womit erstmalig eine selektive Gehaltsbestimmung für das Anhydrid zur Verfügung steht.

Bei Untersuchungen zur Hydrolysestabilität von DNBA erwies sich die Substanz erwartungsgemäß als wesentlich stabiler als das entsprechende Säurechlorid. Unter definierten Bedingungen gelagerte Proben (37°C, Luftfeuchtigkeit 82%) zeigten nach einem Tag noch einen Gehalt von 94%, nach 14 Tagen von 55%. Demgegenüber verringerte sich der Gehalt von 3,5-Dinitrobenzoylchlorid schon nach einem Tag auf 10%, nach 14 Tagen war infolge Hydrolyse keine Reaktivität mehr nachweisbar. Somit bietet sich auch aus Gründen der Stabilität ein Ersatz von 3,5-Dinitrobenzoylchlorid durch DNBA an.

Für die Derivatisierungen wurden aus der Vielzahl der zugelassenen Arzneistoffe mit Aminfunktion zehn mit stark variierender Struktur ausgewählt und mit DNBA umgesetzt. Erfolgreich verliefen die Reaktionen mit den primären aliphatischen Aminen Mexiletin und Baclofen, sowie mit den sekundären aliphatischen Aminen Prilocain, Maprotilin, Fenfluramin und Desipramin, ferner mit den primären aromatischen Aminen Metoclopramid und Procainamid sowie mit dem Carbonsäurehydrazid Isoniazid. Nur Diclofenac, ein sekundäres aliphatisches Amin, reagierte nicht zum Amid, sondern cyclisierte zum Lactam.

Voraussetzung für eine indirekte polarographische Bestimmung ist eine schnell und quantitativ verlaufende Derivatisierungsreaktion. Für die Umsetzung mit DNBA erwies sich 4-Dimethylaminopyridin als Katalysator hocheffektiv. Schon ein dem Analyten äquivalenter Zusatz erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit um das 40 fache gegenüber Pyridin. Der Umsatz einer  $1 \cdot 10^{-4}$  M Lösung des primären Amins Mexiletin ist bei einem 100 %igem Überschuß an DNBA nach 4 Minuten praktisch vollständig.

Die Entwicklung eines elektroanalytischen Verfahrens setzt primär die Prüfung der Stabilität des Analyten im vorgesehenen pH-Bereich voraus. Als Modellsubstanzen dienten Procainamid, Mexiletin und Prilocain. Sie erwiesen sich bei RT über einen Zeitraum von 24 h im pH-Bereich von 2-11 als stabil. Da die

DNBA-Derivate schwer wasserlöslich waren, wurden bis zu 40 % Methanol als Solubilisator zugesetzt. Die polarographischen I-E-Kurven zeigten in Abhängigkeit von der Struktur der Analyten bis zu 4 Stufen. Bei der Aufklärung des zugrundeliegenden Reduktionsmechanismus wurden die Parameter der Ilković-Gleichung sowie der Einfluß von pH-Änderung, Tensiden und Temperatur auf die polarographischen Kurven untersucht, wobei auf ältere Arbeiten des Arbeitskreises Oelschläger zurückgegriffen werden konnte. Der Elektronenverbrauch wurde durch Korrelationsanalyse gegen Nitrazepam (n=4) und 3,5-Dinitrobenzoylpiperidin (n=8) ermittelt. Ergänzend wurde eine Coulometrie mit gerührten Quecksilberelektroden bei konstantem Potential durchgeführt. Die ersten beiden, bei dem positivstem Potential auftretenden polarographischen Stufen entsprechen einer jeweils 4-elektronigen Reduktion beider Nitrogruppen bis zur Hydroxylaminstufe. Dieser Vorgang ist diffusionskontrolliert, und der auftretende Diffusionsgrenzstrom bewegt sich konzentrationsproportional im Bereich von  $5 \cdot 10^{-7}$  M bis  $5 \cdot 10^{-5}$  M (DPP). Das anfallende Bishydroxylaminderivat ließ sich allerdings wegen auftretender Nebenreaktionen nicht isolieren. Die Stufe 3 tritt bei einigen Amiden nur im sauren pH-Bereich auf, bei anderen ist sie über den gesamten untersuchten pH-Bereich nachweisbar. Diese Stufe entspricht einem Verbrauch von 4 Elektronen, sie erweist sich nur in einem kleinen Bereich als konzentrationsabhängig und läßt sich durch Zusatz einer oberflächenaktiven Substanz wie Gelatine vollständig unterdrücken. Die gewonnenen Erkenntnisse sprechen somit für einen nicht ausschließlich diffusionskontrollierten Grenzstrom, Adsorptionsvorgänge an der DME sollten hierbei eine Rolle spielen. Der ermittelte Elektronenverbrauch deutet auf die Reduktion zum Diaminderivat hin. Bei Stufe 4 handelt es sich eindeutig um eine katalytische Wasserstoffabscheidung an der DME. Diese Reduktionsstufe tritt nur bei den Derivaten mit einer zusätzlichen tertiären basischen Aminogruppe auf. Ihre Höhe ist nicht konzentrationsproportional. Für eine Gehaltsbestimmung sind demzufolge nur die beiden ersten Reduktionsstufen nutzbar. Die mit Differentieller Pulspolarographie (DPP) bestimmten Nachweisgrenzen für alle untersuchten 3,5-Dinitrobenzoesäureamide liegen im Bereich zwischen  $4 \cdot 10^{-8}$  M und  $8,5 \cdot 10^{-8}$  M, wobei sich sowohl Stufe 1 als auch Stufe 2 vermessen lassen.



---

Als Nebenprodukt bei der Derivatisierung entsteht zwangsläufig die ebenfalls aktive 3,5-Dinitrobenzoesäure. Eine vollständige Auftrennung der Reduktionsstufen von Amid und Säure, z.B. durch Variation des pH-Wertes, gelang nicht, so daß die Säure vor der polarographischen Bestimmung entfernt werden mußte. Dies gelang über einen basischen Anionenaustauscher, auch eine dünnschichtchromatographische Abtrennung war möglich. Beide Verfahren führen mit einer Wiederfindungsrate von ca. 95% zu vergleichbaren Ergebnissen. Die dünnschichtchromatographische Trennung ist universeller einsetzbar, da sie auch für Amine mit einer Carboxylgruppe, z. B. Baclofen, geeignet ist. Die indirekte polarographische Bestimmung von Aminen beinhaltet somit Derivatisierung, chromatographische Trennung und polarographische Messung. Der Zeitaufwand von 30-40 Minuten ist angemessen.

Neben der indirekten polarographischen Bestimmung eignet sich die Umsetzung mit 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid auch für eine Vorsäulenderivatisierung in der HPLC, da die UV-Absorption der 3,5-Dinitrobenzoesäureamide gegenüber den Ausgangssubstanzen teilweise um den Faktor 50 erhöht ist.

---

---

## 6 Abkürzungen

BRP	Britton-Robinson-Puffer
c	Konzentration
D	Diffusionskoeffizient
d. Th.	der Theorie
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DC <sub>T</sub>	Gleichspannungstastpolarographie
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DME	Quecksilbertropfelektrode (dropping mercury electrode)
DNB	3,5-Dinitrobenzoyl
DNBA	3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid
DPP	Differentielle Pulspolarographie
E	Spannung
E <sub>1/2</sub>	Halbstufenpotential (DC <sub>T</sub> )
E <sub>Peak</sub>	Peakpotential (DPP)
F	Faraday-Konstante
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
I	Stromstärke
i. Vak.	im Vakuum
I <sub>D</sub>	Diffusionsgrenzstrom
I-E-Kurven	Strom-Spannungs-Kurven
I <sub>P</sub>	Spitzenstrom
IR	Infrarot
m	Ausflußgeschwindigkeit des Quecksilbers
M	Molmasse
m/v	Masse/Volumen
MME	multi-mode-elektrode
MS	Massenspektroskopie
n	Anzahl der Elektronen

---

---

NMR	Kernmagnetische Resonanz
PPY	4-Pyrrolidinyl-Pyridin
Q	Ladungsmenge
R	Allgemeine Gaskonstante
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie
Schmp.	Schmelzpunkt
T	Temperatur
TK	prozentualer Temperaturkoeffizient
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
α	Durchtrittsfaktor

## 7      **Abbildungsverzeichnis**

<u>Abb. 1:</u>	Möglichkeiten der polarographischen Funktionalisierung.....	8
<u>Abb. 2:</u>	Derivatisierung von Ketonen mit Girard-Reagenz T .....	12
<u>Abb. 3:</u>	Mechanismus der Nitrierung am Beispiel von Phenacetin [nach Oelschläger 1969] <sup>33</sup> .....	13
<u>Abb. 4:</u>	Synthese von DNBA nach Oelschläger (1984).....	15
<u>Abb. 5:</u>	Synthese von Anhydriden nach Palomo-Coll (1981) <sup>48</sup> .....	16
<u>Abb. 6:</u>	Synthese von DNBA mit DCC .....	21
<u>Abb. 7:</u>	Chromatogramm der Gehaltsbestimmung von DNBA mittels Piperidin ....	23
<u>Abb. 8:</u>	Zerfall von DNBA (-♦-) und 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (-■-) bei Lagerung (37°C und Luftfeuchtigkeit 82%) .....	24
<u>Abb. 9:</u>	Cyclisierung von Diclofenac.....	27
<u>Abb. 10:</u>	Reaktion von Anhydriden mit DMAP <sup>57</sup> .....	31
<u>Abb. 11:</u>	Umsetzung von Mexiletin-HCl ( $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) mit DNBA bzw. 3,5-Dinitrobenzoylchlorid ( $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l) bei 25 °C mit Zusatz von Pyridin ( $4 \cdot 10^{-4}$ mol/l) und DMAP ( $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l). Der Umsatz wurde durch HPLC bestimmt. ....	33
<u>Abb. 12:</u>	DPP-Polarogramme der 3,5 Dinitrobenzoesäureamide .....	35
<u>Abb. 13:</u>	N-N-Spaltungen an der DME (oben: Isoniazid, unten: N-Nitroso-Ketamin) <sup>38</sup>	
<u>Abb. 14:</u>	Zersetzung von 3,5-Dinitrobenzoylprocainamid in 0,1 M-NaOH (Methanolzusatz 40%) .....	39
<u>Abb. 15:</u>	Beziehung zwischen Peakpotential und pH-Wert einer $10^{-5}$ M-Lösung des DNB-Procainamid (BRP bzw. 0,1 M-HCl unter Zusatz von 10% Methanol) <sup>40</sup>	
<u>Abb. 16:</u>	DCT-Polarogramme von 3,5-Dinitrobenzoylprocainamid bei versch. pH Werten.....	42
<u>Abb. 17:</u>	DPP-Polarogramme von 3,5-Dinitrobenzoylprocainamid bei versch. pH-Werten.....	42
<u>Abb. 18:</u>	Abhängigkeit des Spitzenstromes von Peak 1 ( $R^2 = 0,9973$ ) und Peak 2 ( $R^2 = 0,9998$ ) von der Konzentration an DNB-Procainamid (BRP; pH 1,89; 40% Methanolzusatz).....	43

<u>Abb. 19:</u>	Abhängigkeit des Spitzenstromes von Peak 3 von der Konzentration an DNB-Procaïnamid bei verschiedenen pH-Werten (BRP; 10% Methanolzusatz).....	44
<u>Abb. 20:</u>	Abhängigkeit des Spitzenstromes von Peak 4 von der Konzentration an DNB-Procaïnamid bei pH 10,53 (BRP; 10% Methanolzusatz).....	45
<u>Abb. 21:</u>	Einfluß von Gelatine auf $i_p$ (Peak 3).....	48
<u>Abb. 22:</u>	Logarithmische Analyse der polarographischen Stufen ( $DC_T$ ) bei verschiedenen pH-Werten (DNB-Procaïnamid $1 \cdot 10^{-5}$ M) .....	50
<u>Abb. 23:</u>	Katalytische Wasserstoffabscheidung nach von Stackelberg .....	57
<u>Abb. 24:</u>	IR-Spektrum von DNBA .....	70
<u>Abb. 25:</u>	IR-Spektren des 1,3-Dicyclohexylharnstoffs (oben) und des 3,5-Dinitrobenzoyldicyclohexylharnstoffs (unten).....	71
<u>Abb. 26:</u>	IR-Spektrum von <i>N</i> -[2-(Diethylamino)ethyl]-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)-amino]benzamid.....	73
<u>Abb. 27:</u>	IR-Spektrum von <i>N</i> '-(3,5-Dinitrobenzoyl)isonicotinohydrazid (DNB-Isoniazid).....	74
<u>Abb. 28:</u>	IR-Spektrum von <i>N</i> -[3-(10,11-Dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[ <i>b,f</i> ]azepin-5-yl)propyl]- <i>N</i> -methyl-3,5-dinitrobenzamid.....	75
<u>Abb. 29:</u>	IR-Spektrum von ( <i>RS</i> )- <i>N</i> -{1-[(2-methylphenyl)carbamoyl]ethyl}-3,5-dinitro- <i>N</i> -propylbenzamid.....	76
<u>Abb. 30:</u>	IR-Spektrum von ( <i>RS</i> )-3-(4-Chlorphenyl)-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)amino]-butansäure .....	77
<u>Abb. 31:</u>	IR-Spektrum von 1-(2,6-Dichlorphenyl)-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-on .....	78
<u>Abb. 32:</u>	IR-Spektrum von 5-Chlor- <i>N</i> -[2-(diethylamino)ethyl]-4-[(3,5-dinitrobenzoyl)amino]-2-methoxybenzamid.....	79
<u>Abb. 33:</u>	IR-Spektrum von ( <i>RS</i> )- <i>N</i> -[2-(2,6-dimethylphenoxy)-1-methylethyl]-3,5-dinitrobenzamid .....	80
<u>Abb. 34:</u>	IR-Spektrum von <i>N</i> -[3-(9,10-Dihydro-9,10-ethanoanthracen-9-yl)propyl] - <i>N</i> -methyl-3,5-dinitrobenzamid.....	81
<u>Abb. 35:</u>	IR-Spektrum von ( <i>RS</i> )- <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -{1-methyl-2-[3-(trifluormethyl)phenyl]ethyl}-3,5-dinitrobenzamid.....	82

## 8 Tabellenverzeichnis

<u>Tab. 1:</u>	Nachweisgrenzen polarographischer Verfahren .....	4
<u>Tab. 2:</u>	An der DME polarographisch aktive Molekülbestandteile (Auswahl).....	5
<u>Tab. 3:</u>	Übersicht über indirekte polarographische Bestimmungen .....	9
<u>Tab. 4:</u>	Arzneistoffe mit primären bzw. sekundären Aminogruppen (Auswahl).....	18
<u>Tab. 5:</u>	Synthesen von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid.....	21
<u>Tab. 6:</u>	Ausgewählte Arzneistoffe für die Reaktion mit 3,5-Dinitrobenzoesäure- anhydrid .....	26
<u>Tab. 7:</u>	Schmelzpunkte der 3,5-Dinitrobenzoesäureamide einiger Arzneistoffe .....	28
<u>Tab. 8:</u>	Reaktionsdauer für einen Umsatz > 99% von Procainamid (ohne Basenzusatz, Analytkonzentration $10^{-3}$ M).....	29
<u>Tab. 9:</u>	Geschwindigkeit der Acylierung von Mexiletin-HCl ( $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) und Desi- pramin-HCl ( $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) mit DNBA ( $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l) bei 25 °C in Abhängig- keit von der Pyridinkonzentration. Der Umsatz wurde durch HPLC bestimmt.....	30
<u>Tab. 10:</u>	Geschwindigkeit der Acylierung von Mexiletin-HCl ( $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) mit DNBA ( $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l), Pyridin ( $3 \cdot 10^{-4}$ mol/l) und DMAP ( $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) bei 25 °C. Der Umsatz wurde durch HPLC bestimmt. ....	32
<u>Tab. 11:</u>	Auswertung der polarographischen Kurven (pH 7,03, gegen Ag/AgCl) .....	37
<u>Tab. 12:</u>	Nachweis- und Erfassungsgrenzen der untersuchten Amide bei pH 7,03 (DPP; BRP; Methanolzusatz 40%).....	46
<u>Tab. 13:</u>	Beeinflussung des Grenzstroms $i_D$ durch die Gelatinekonzentration .....	47
<u>Tab. 14:</u>	Temperaturkoeffizienten bei verschiedenen pH-Werten .....	49
<u>Tab. 15:</u>	Anstiege (A) und daraus berechnete Faktoren ( $n\alpha$ ) und Anzahl der beim geschwindigkeitsbestimmenden Schritt umgesetzten Protonen (p).....	52
<u>Tab. 16:</u>	Durch Vergleich der Stufenhöhen ermittelter Elektronenverbrauch (DNB- Procainamid $1 \cdot 10^{-4}$ M, BRP).....	53
<u>Tab. 17:</u>	Elektronenverbrauch durch Coulometrie ermittelt (Elektrolysespannung nach der 2. Stufe) .....	54
<u>Tab. 18:</u>	Vergleich der Molaren Absorptionskoeffizienten der Modellsubstanzen und ihrer 3,5-Dinitrobenzoesäurederivate.....	62

---

## 9 Literaturverzeichnis

---

- 1 Heyrovsky, J. Chem. listy  
16, 256 (1922)
- 2 Engels S. ABC Geschichte der Chemie  
Stolz R. S. 143, Verlag für Grundstoff-  
industrie Leipzig 1989
- 3 Barker G.C. Z. analyt. Chem.  
Gardner A.W. 173, 79 (1960)
- 4 Buchberger W. Elektrochemische Analysen-  
verfahren, S. 85  
Spektrum Verlag Heidelberg 1998
- 5 Hoffman H. Pharmazie heute  
2, 35 (1976)
- 6 Kissinger P.T. Electroanalysis  
4, 359 (1992)
- 7 Medizinische B-Schutz-Tagung München 2000  
Sanitätsakademie der Bundeswehr
- 8 Zapletalek A. Collection  
11, 28 (1939)
- 9 Discherl W. Biochem. Z.  
Breuer H. 321, 508 (1951)
- 10 Bister F. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)  
Wolff H.J. 3, 481 (1953)
- 11 Warshowsky B. Ind. Eng. Chem.  
Elving P. Anal. Ed. 18, 253 (1946)
- 12 Boyd M.J. Ind. and eng. Chem.  
Bambach K. 15, 314 (1943)
- 13 Heusghem C. J. Pharm. Belg.  
5, 3 (1950)
- 14 Oelschläger H. Arch. Pharm.  
Hoffmann H. 299, 1025 (1966)

- 
- 
- 15 Hoffmann H. Arch. Pharm.  
305, 254 (1972)
- 16 Modrack G. Dissertation Universität  
Frankfurt a. Main 1983
- 17 Oelschläger H. Arch. Pharm.  
Bunge K. 307, 410 (1973)
- 18 Spohn R. Dissertation Universität  
Frankfurt a. Main 1979
- 19 Hennig K. Z. Lebensmitteluntersuch. Forsch.  
Burkhardt R. 92, 245 (1951)
- 20 Warshowsky B. Anal. Chem.  
Rice M. 20, 341 (1948)
- 21 Zuman P. Topics in organic Polarography  
S. 334, Plenum Press, London,  
New York 1970
- 22 Wolfe J. J. Biol. Chem.  
Hershberg E.B. 136, 653 (1940)
- 23 Heusghem C. J. Pharm. Belg.  
5, 3 (1950)
- 24 Neish W.J.P. Rec. Pay-Bas  
72, 105 (1953)
- 25 Zuman P. Chem. listy  
Santavy F. 46, 393 (1952)
- 26 Zuman P. Coll. Czech. Chem. Comm.  
18, 28 (1953)
- 27 Souchay P. Chimie anal.  
Graizon M. 24, 85 (1942)
- 28 Baggesgaard Rasmussen A. H. Dansk Tidskr. Farm.  
Hahn C. 19, 41 (1945)
- 29 Baggesgaard-Rasmussen M.H. Ann. Pharm. Franc.  
10, 693 (1952)



- 
- 30** Lund H. Acta Chem. Scand.  
**12**, 1444 (1958)
- 31** Brooks M.A. Anal. Chim. Acta  
De Silva J.A.F. **64**, 165 (1973)  
Hackman M.R.
- 32** Wiegrebe W. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)  
Wehrhahn L. **25**, 517 (1975)
- 33** Oelschläger H. Arch. Pharm.  
Hoffmann H. **302**, 43 (1969)  
Matthiesen U.
- 34** Besso Z. Anal. chim. Acta  
Monnier D. **7**, 286 (1952)  
Wenger P.E.
- 35** Monnier D. Helv. Chim. Acta  
Rusconi Y. **34**, 1297 (1951)
- 36** Novotny B. Ceskoslov. Farm  
**3**, 12 (1954)
- 37** Burghardt H. J. Electroanal. Chem.  
Jäger H. **17**, 1919 (1968)  
von Stackelberg M.
- 38** De Marco A. Farm. Ed. Prat.  
Megarelli E. **22**, 795 (1967)
- 39** Poethke W. Pharmazie  
Köhne H. **22**, 639 (1967)
- 40** Fürst W. Pharm. Zentralh.  
**107**, 184 (1968)
- 41** Müller M. Dissertation Universität  
Frankfurt a. Main 1981
- 42** Hehner Ch. Dissertation Universität  
Frankfurt a. Main 1976
- 43** Oelschläger H. Arch. Pharm.  
Fritsch H. **318**, 759 (1985)

- 
- 44** Oelschläger H.  
Fritsch H. Arch. Pharm.  
**317**, 834 (1984)
- 45** Adams R.  
Wirth W.V. J. Am. Chem. Soc.  
French H.E. **40**, 424 (1918)
- 46** Reichstein T.  
**9**, 799 (1926) Helv. Chim. Acta
- 47** Buu-Hoi N.P.  
Jaquignon P. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas  
Roussel O. **82**, 370 (1963)
- 48** Palomo-Coll A.L.  
Cabre-Castellvi J. Synthesis  
**8**, 616 (1981)
- 49** Scriba G.K.E.  
Sabbah S. Chromatographia  
Abu-Khurmah M. (im Druck)  
Oelschläger H.
- 50** Cadby P.A.  
Hearn M.T.W. Aust. J. Chem.  
Ward A.D. **26**, 557 (1973)
- 51** Weintraub S.T.  
**65**, 2400 (1993) Anal. Chem.
- 52** Chen F.M.  
Kuroda K. Synthesis  
Benoiton M.L. **5**, 928 (1978)
- 53** Zetsche F.  
Fredrich A. Ber. Dtsch. Chem. Ges.  
**72**, 1735 (1939)
- 54** Vowinkel E.  
**100**, 16 (1967) Chem. Ber.
- 55** Müller E. (Hrsg.)  
(Houben-Weyl), Bd. XV/2, S. 528  
Thieme Verlag Stuttgart 1952 Methoden der organischen Chemie
- 56** Zajac M.  
Stanisz B. Acta Pol. Pharm.  
Musial W. **55**, 371 (1998)

- 
- 57** Litvenko L.M.  
Kirichenko A.I.  
176, 97 (1967) Dokl. Akad. Nauk SSSR Ser.  
Khim
- 58** Höfle G.  
Steglich W.  
Vorbrüggen H. Angew. Chem.  
90, 602 (1978)
- 59** Geißler M. Polarographische Analyse, S. 130  
Verlag Chemie Weinheim 1981
- 60** Gitis S.S.  
7, 1898 (1971) J.Org.Chem.USSR (Engl.Transl.)
- 61** Dumanovic D.  
Miloradovic M.  
Kosanovic Dj. Collect. Chem. Commun.  
36, 404 (1971)
- 62** Oelschläger H.  
El-Hossny T. Arch. Pharm.  
316, 412 (1983)
- 63** Schlitt L.  
Rink M.  
von Stackelberg M. J. Electroanal. Chem.  
13, 10 (1967)
- 64** Elving P.J.  
7, 423 (1963), Pure Appl. Chem.
- 65** Persiantseva V. P.  
Rozenfel'd I. L.  
Kerbeleva I. Ya. Korroz. Zashch. Metal.  
6, 133 (1970)
- 66** Nürnberg H. W.  
von Stackelberg M. J. Electroanal. Chem.  
2, 350 (1961)
- 67** Whittaker J.W.  
Osteryoung J. Anal. Chem.  
48, 1418 (1976)
- 68** Chen Hong-Yan  
Neeb R. Fresenius Z. Anal. Chem.  
319, 240 (1984)
- 69** Tomilov A.P.  
Mairanovskii S.G.  
Fioshin M.Ya.  
Smirnov V.A. Electrochemistry of organic  
compounds, S. 239,  
Halsted Press Jerusalem 1972

- 
- 70** Oelschläger H. Arch.Pharm.  
Volke J. **302**, 241 (1969)  
Lim G.T.
- 71** Heyrovsky M. J. Electroanal. Chem.  
Vavricka S. **26**, 399 (1970)  
Holleck L.
- 72** von Stackelberg M. Zeitschr. f. Elektrochem.  
Hans W. **62**, 839 (1958)  
Jensch W.
- 73** von Stackelberg M. Zeitschr. f. Elektrochem.  
Fassbender H. **62**, 834 (1958)
- 74** Oelschläger H. Arch. Pharm.  
Bunge K. **307**, 796 (1974)  
Lim G.T.  
Kraft G.
- 75** Oelschläger H. Z. Anal. Chem.  
Lumbantorian S. **279**, 257 (1976)  
Volke J.  
Kraft G.
- 76** Thammilehto S. Phar. Acta Helv.  
Perälä M. **46**, 351 (1971)
- 77** Fuji Y. J. Chromatogr. Sci.  
Oguri R. **21**, 495 (1983)  
Mitsuashi A.  
Yamazaki M.
- 78** Embree L. J. Chromatogr.  
McErlane K. **526**, 439 (1990)
- 79** von Bruchhausen F. Hagers Handbuch, 5 Aufl., Bd. 7,  
(Hrsg.) S. 1206, Springer Verlag  
Berlin, Heidelberg 1993
- 80** Dibbern H.W. UV-und IR-Spektren wichtiger  
Wirbitzki E. pharmazeutischer Wirkstoffe  
Editio Cantor Aulendorf 1978
- 81** Calderazzo F. Inorg. Chem.  
**4**, 293 (1965)

- 
- 82** Moser P.  
Sallmann A.  
Wiesenberg J. J. Med Chem.  
**33**, 2358 (1990)
- 83** Isakovich J.P.  
Azimov V.A.  
Ryabova S. Pharm. Chem. J.  
**29**, 100 (1995)
- 84** Franchimont A.P.N.  
van Rign W.  
Friedemann H. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas  
**26**, 232 (1914)

## Lebenslauf

Name: Wolfgang Köhler  
Geburtsdatum: 07.05.1968  
Geburtsort: Dresden  
Familienstand: ledig  
Wohnort: 04107 Leipzig, Härtelstr. 9b  
Staatsbürgerschaft: Bundesrepublik Deutschland

1974 bis 1984 Polytechnische Oberschule „Richard-Wagner“, Leipzig  
1984 bis 1986 Erweiterte Oberschule „Humboldt“, Leipzig  
1986 Abitur mit Prädikat „Auszeichnung“  
1986 bis 1989 Wehrdienst  
1989 bis 1992 Chemiestudium TU Dresden  
1992 Diplom-Vorprüfung im Fach Chemie, Note: 1,25  
1991 bis 1995 Pharmaziestudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
1996 Pharmazeutische Prüfung, Gesamtnote: 1,2  
17.12.1996 Approbation als Apotheker  
Nov. 1995 bis April 1996 Praktikum in der „Apostel-Apotheke“ München  
Mai 1996 bis Nov. 1996 Einführung in die Bearbeitung wissenschaftlicher Probleme am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena  
ab Nov. 1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am gleichen Lehrstuhl, Anfertigung einer Promotionsarbeit zum Thema „Untersuchungen zum Einsatz von 3,5-Dinitrobenzoesäureanhydrid zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung von Amininen, einschließlich einer Methode zur polarographischen Gehaltsbestimmung“

Jena, 30.11.01

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 30.11.01