

Untersuchungen über die Spaltung von synthetischem Pentazocin-Glucuronid mit Salzsäure*

S. Goenechea¹, G. Rücker², M. Langer¹ und M. Neugebauer²

¹ Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn,
Stiftsplatz 12, D-5300 Bonn 1, Bundesrepublik Deutschland

² Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn,
Kreuzbergweg 26, D-5300 Bonn 1, Bundesrepublik Deutschland

Studies on the Cleavage of Synthetic Glucuronide of Pentazocine with Hydrochloric Acid

Summary. It has been reported before that pentazocine (I) and pentazocine-glucuronide (II) form an artifact (III) by the addition of water to the double bond in the presence of HCl. This reaction leads to different results concerning the investigation of the rate of hydrolysis of II and the recovery of I. The glucuronide was quantitatively hydrolyzed by 20% HCl, but yielded only 15% of I (about 64% was detected as III). With 5% HCl the rate of hydrolysis only amounted to 40%–43%, whereas I yielded 31% (only 9% was recovered as III). The best III yield was obtained with a HCl concentration of 17.5%.

Key words: Pentazocine – Glucuronide, cleavage – Toxicology, pentazocine

Zusammenfassung. Bei der Behandlung von Pentazocin (I) und Pentazocin-glucuronid (II) mit Salzsäure wird bekanntlich durch Anlagerung von Wasser an die Doppelbindung ein Artefakt (III) gebildet. Dies führt zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Hydrolyserate von II und der Wiederfindung von I. Mit 20% HCl wurde die Glucuronidbindung quantitativ gespalten, aber die Ausbeute an I lag bei nur 15% (ca. 64% der berechneten Menge wurden als III wiedergefunden); mit 5% HCl betrug die Hydrolyserate nur 40%–43%, die Pentazocinausbeute jedoch 31% (nur 9% wurden als III wiedergefunden). Die höchste Ausbeute an III wurde mit HCl-Konzentrationen von 17,5% (30 min im siedenden Wasserbad) erzielt.

* Auszugsweise auf der 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (Hamburg) September 1985 vorgetragen

Schlüsselwörter: Pentazocin – Glucuronid, Spaltung – Toxikologie, Pentazocin

Pentazocin (**I**) (1,2,3,4,5,6-Hexahydro-6,11-dimethyl-3-(3-methyl-2-butenyl)-2,6-methano-3-benzazocin-8-ol; Handelspräparat Fortral) unterliegt im menschlichen Organismus einer Oxidation der terminalen Methylgruppe der Dimethylallyl-Seitenkette (Pittmann 1970) und einer Konjugation der phenolischen OH-Gruppe (Berkowitz 1969).

Im Harn werden relativ kleine Mengen an unverändertem I (Abb. 1) ausgeschieden, nach oraler Gabe etwa 3 bis 15% der Dosis (Beckett et al. 1970a,b; Berkowitz 1969) und ca. 8 bis 24% nach intravenöser Applikation (Beckett et al. 1970a,b). Etwa 12 bis 28% der Substanz erscheinen im Harn als Glucuronid (II) (Abb. 1) (Berkowitz et al. 1969).

Die Glucuronidsplattung stellt deshalb einen wichtigen Schritt beim Nachweis eines fraglichen Pentazocin-Konsums dar; es ist aber bekannt, daß I durch säurekatalysierte Hydratisierung der Allylseitenkette das Artefakt III (Abb. 1) bildet (Kigasawa et al. 1976; Reid et al. 1981; Gielsdorf et al. 1982), wodurch die Pentazocin-Ausbeute verringert wird. Aus diesem Grunde wurde bereits die enzymatische Hydrolyse empfohlen (Stoner et al. 1979).

Ziel dieser Arbeit war, das Verhalten des Pantazocinglucuronids (II) gegenüber Salzsäure systematisch zu untersuchen. Dabei sollten durch Bestimmung der Ausbeuten an I und III die Hydrolyseraten unter verschiedenen Bedingungen – darunter auch unter den Bedingungen dreier bei Harn-„screenings“ häufig angewandter Methoden – ermittelt werden. Für die Untersuchungen wurde synthetisiertes Pentazocinglucuronid verwendet.

Arbeitsmethodik

Quantitative DC

HPTLC-Fertigplatten (Merck), Kieselgel 60F₂₅₄ für die Nano-DC (10 × 10 cm) TLC/HPTLC Scanner (Camag) mit Spectra-Physics SP 4270 Integrator. Quecksilberdampflampe 366 nm; Kantenfilter 400 nm; Spaltbreite 0,7 mm; Spaltlänge 7,0 mm.

500 nl Glaskapillare mit Nanomat (Camag). Fließmittel Hexan-Essigester-Ethanol-25% NH₄OH (25 + 50 + 5 + 2). In den Trog wurde zusätzlich ein Glas mit konz. NH₄OH gestellt. Detektion: Tauchbad zur Fluoreszenzanregung: 10 ml 1% K₃[Fe(CN)₆]-Lösung und 10 ml 4N-NaOH wurden mit 80 ml Wasser gemischt und mit Methanol auf 500 ml aufgefüllt. Nach

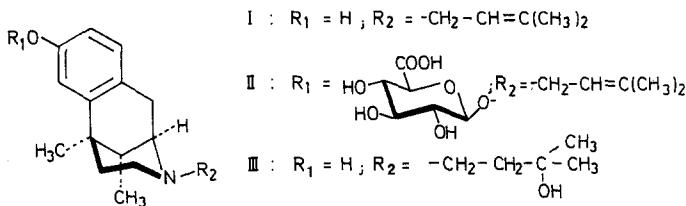


Abb.1. Strukturformel von Pentazocin (I), Pentazocinglucuronid (II) und von dem Hydratisierungsprodukt des Pentazocin (III)

dem Tauchen wurden die Platten 2 h bei 130° im Trockenschrank getrocknet. Rf-Werte: I: 0,67; III: 0,34.

GC: DANI 3400 (DANI Analysentechnik, Mainz-Kastel) mit Shimadzu-Chromatopac-Integrator C-R2A(X). Gepackte Glassäule, 2 m lang, 2 mm innerer Durchmesser. Stationäre Phase 3% SP-2250-DB Supelcoport 100/120 mesh. Trägergas 35 ml N₂/min. Injektionstemp. 260°C; Ofentemp. 220°C (isotherm); FID. Detektortemp. 260°C. Innerer Standard: 2-Amino-5-chlor-benzophenon.

Probenmenge: 1 µl. Kovats-Indices: I: 2603; III: 2763; 2-Amino-5-chlor-benzophenon: 2442.

Synthesen

Die Synthese von II gelang durch Umsetzung von I mit Pivaloylbromglucuronsäureester (Vlahov und Snatzke 1983) nach der Methode von Yoshimura et al. 1968 (Langer 1985). Die Synthese von III erfolgte durch 30 min Erwärmen von I in 37% Salzsäure (Kigasawa et al. 1976; Langer 1985).

Hydrolyseversuche

Je 10 ml einer wässrigen Lösung der Reinsubstanzen (I: 20,0 mg/l, II: 32,8 mg/l) wurden unter folgenden Bedingungen hydrolysiert:

Methode I: (Geldmacher-v. Malinckrodt et al. 1970; Schütz 1971): Die Hydrolyse wurde mit 20% Salzsäure durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde auf dem Drahtnetz 6 min im offenen Gefäß zum Sieden erhitzt.

Methode II: Die Hydrolyse erfolgte mit 12,5% Salzsäure. Das Reaktionsgemisch wurde im offenen Gefäß im siedenden Wasserbad 30 min erhitzt.

Methode III: (Kamm et al. 1969): Es wurde mit 5% Salzsäure 30 min lang im siedenden Wasserbad unter Rückfluß hydrolysiert.

Methode IV: Zusätzlich wurden Hydrolysen in Wasser, 2,5%, 5,0%, 7,5%, 10,0%, 12,5%, 15,0%, 17,5% und 20,0% Salzsäure durchgeführt. Die Lösungen wurden jeweils 30 min unter Rückflußkühlung im siedenden Wasserbad erwärmt.

Extraktion und quantitative Bestimmung

Nach Spülen des Rückflußkühlers mit 25 ml Wasser wurden die Hydrolysate im Kühlschrank auf +4°C abgekühlt, mit 10% NaOH neutralisiert und mit Borax-Puffer (pH 8,5) auf pH 8,5 eingestellt. Es wurde dreimal mit Dichlormethan/Isopropanol (9 + 1) extrahiert, die vereinigten Extrakte mit Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer (40°C, Wasserbad) eingedampft. Man überführte den Rückstand mit 2–3 ml Dichlormethan in ein Schliffstopfenglas und entfernte das Lösungsmittel mit N₂ bei 40°C (Wasserbad). Nach Zugabe von 0,50 ml einer Lösung von 45,5 mg/l 2-Amino-5-chlorbenzophenon in Chloroform erfolgte GC- bzw. DC-Analyse.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Ermittlung der Hydrolyserate des Glucuronids wurden unter den gleichen Bedingungen Vorversuche zur Stabilität des Aglykons durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß unter den Bedingungen von Methode IV die Ausbeute an III von 0% (im Wasser) auf 62–65% mit 12,5% HCl und auf ca. 70% mit HCl-Konzentrationen zwischen 15,0% und 17,5% stieg (Abb. 2). Entsprechend waren die Wiederfindungsraten an I, die mit 2,5% HCl mehr als 95% betrugen und mit 12,5% HCl bei nur 10–15% lagen (Abb. 2).

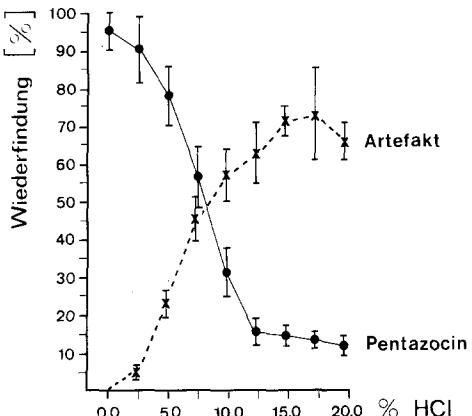


Abb. 2. Wiederfindung an Pentazocin (I) und Artefakt (III) nach Behandlung von I mit HCl (30 min unter Rückfluß im siedenden Wasserbad; Methode IV)

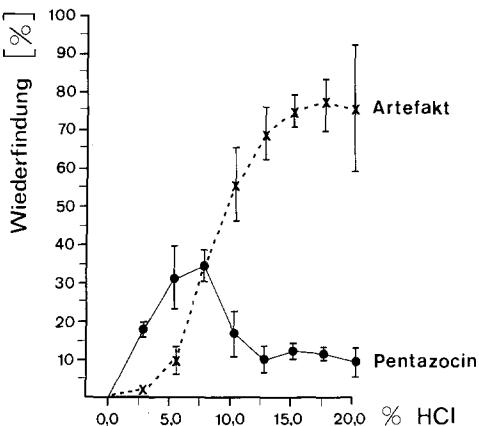


Abb. 3. Wiederfindung an Pentazocin (I) und Artefakt (III) nach Spaltung von Pentazocinglucuronid (II) mit HCl (30 min unter Rückfluß im siedenden Wasserbad; Methode IV)

Bei den Hydrolyseversuchen mit dem Glucuronid (Methode IV) wurden die höchsten Wiederfindungsraten an Aglykon bei HCl-Konzentrationen von 5,0% bis 7,5% erzielt (22–34%). Säurekonzentrationen von mehr als 12,5% ergaben noch niedrigere Ausbeuten von etwa 10–14% (Abb. 3). Erwartungsgemäß erhöhte sich mit steigender HCl-Konzentration (von 5,0% aufwärts) die Ausbeute an Artefakt, sie erreichte mit 15,0% und 17,5% HCl ein Maximum mit Werten zwischen 74% und 79% (Abb. 3). Die Diskrepanz zwischen der Hydrolyserate des Glucuronids und der Pentazocinausbeute wurde deutlich, wenn die Spaltung des Glucuronids unter sehr unterschiedlichen Hydrolysebedingungen verglichen wurde.

Mit 20% HCl (Methode I) wurde das Glucuronid (II) quantitativ gespalten; allerdings lagen nur etwa 15% des Reaktionsproduktes als Pentazocin vor. Etwa 64% I waren in das Artefakt III überführt worden. Mit 5% HCl (Methode III) betrug die Hydrolyserate zwar etwa 40–43%. Es wurden aber nur 9% I zu III umgesetzt.

Die Gesamtwiederfindungsrate, d. h. die Summe von I und III stieg bei der hydrolytischen Spaltung des Glucuronids zwischen wässriger Lösung und 15%

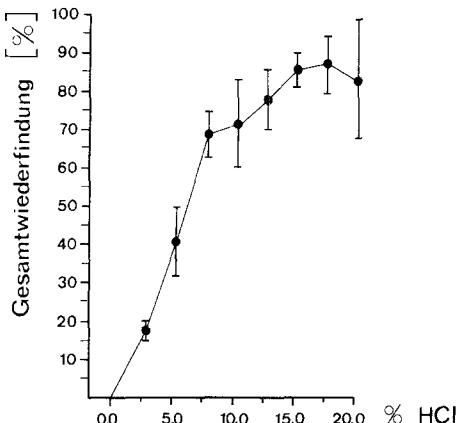


Abb. 4. Gesamt wiederfindung (Summe von Pentazocin (I) und Artefakt (III)) nach Spaltung von Pentazocinglucuronid (II) mit HCl (30 min unter Rückfluß im siedenden Wasserbad; Methode IV)

HCl – wie die Hydrolyseversuche nach Methode IV zeigen – kontinuierlich an; mit höheren HCl-Konzentrationen sanken die Werte im Mittel von knapp 90% (mit 17,5% HCl) auf ca. 84% (mit 20% HCl) etwas ab (Abb. 4).

Interessant ist der Vergleich der Versuchsergebnisse mit 20% HCl unter den Bedingungen von Methode I und denen von Methode IV. Mit Methode I betrug die Wiederfindung von I – wie oben erwähnt – 15%; ca. 64% wurden als Artefakt III wiedergefunden. Die entsprechenden Werte mit Methode IV waren etwa 10% I und ca. 74% Artefakt III.

Die Hydrolysedauer hat also keinen Einfluß auf die Hydrolyserate, die unter den Bedingungen von Methode IV ebenfalls 100% betrug. Sie hat nur geringen Einfluß auf die Gesamt wiederfindung, was z. T. auf die höhere Reaktions temperatur (Siedetemperatur des azeotropen Gemisches 108,6°C) zurück geführt werden könnte. Dagegen sprechen die Ergebnisse der Hydrolyseversuche mit 15,0% und 17,5% HCl unter den Bedingungen von Methode IV, die trotz niedrigerer Reaktionstemperatur und geringerer Säurekonzentration die besten Resultate lieferten.

Die in dieser Arbeit erzielten Untersuchungsergebnisse haben früher mit anderen Glucuroniden gemachte Erfahrungen (Goenechea et al. 1978a, b, 1979, 1980, 1983) bestätigt; mit niedrigeren HCl-Konzentrationen (unter 10%) erhält man niedrigere Hydrolyseraten und damit auch geringe Aglykon ausbeuten. Mit hohen HCl-Konzentrationen (mind. 15%) erreicht man dagegen eine quantitative oder nahezu quantitative Spaltung der Glucuronidbindung: dies ist jedoch keine Garantie für eine hohe Aglykon ausbeute, welche entscheidend von der Säurebeständigkeit und der Thermostabilität des Aglykons abhängt.

Bei Verdacht auf Arznei- oder Betäubungsmittelmissbrauch versprechen nach den bisherigen Erfahrungen die drastischen Bedingungen – mit HCl-Konzentrationen um 20% – die besten Resultate; die Anwendung solcher Hydrolysemethoden ist auch bei Verdacht auf einen Pentazocinkonsum vertretbar, wenn darauf geachtet wird, daß das Artefakt III nachgewiesen und in die quantitative Bestimmung einbezogen wird. Bei Untersuchungen, die gezielt nur auf I durchgeführt werden, sollten geringere Säurekonzentrationen (Methode IV mit 15–17,5% HCl) eingesetzt werden.

Literatur

1. Beckett AH, Taylor JF, Kourounakis P (1970a) The absorption distribution and excretion of pentazocine in man after oral and intravenous administration. *J Pharm Pharmacol* 22: 123–128
2. Beckett AH, Kourounakis P, Vaughan DP, Mitchard M (1970b) The absorption, blood concentrations and excretion of pentazocine after oral, intramuscular or rectal administration to man. *J Pharm Pharmacol* 22 [Suppl] 169S–174S
3. Berkowitz B, Way EL (1969) Metabolism and excretion of pentazocine in man. *Clin Pharmacol Ther* 10: 681–689
4. Geldmacher-v. Mallinckrodt M, Mang U (1970) Schnellnachweis von Metaboliten des Methaqualon und der Clordiazepoxid-Gruppe im Harn. *Z Klin Chem Klin Biochem* 8: 259–262
5. Gielsdorf W, Klug E, Tümmers M (1982) Zum Nachweis von Pentazocin (Fortral) im menschlichen Harn: Gaschromatographisch/massenspektrometrische Untersuchungen. *Z Rechtsmed* 89: 181–189
6. Goenechea S, Goebel K-J (1978a) Verhalten von Morphin-3-glucuronid bei der Hydrolyse mit Salzsäure. *Beitr Gerichtl Med* 36: 503–507
7. Goenechea S, Kobbe K, Goebel K-J (1978b) Verhalten von Codein and Codein-6-glucuronid bei der Hydrolyse mit Salzsäure. *Arzneimittelforsch* 28: 1070–1071
8. Goenechea S, Kobbe K, Goebel K-J (1979) Verhalten von p-Nitrophenylglucuronid bei der Spaltung mit Mineralsäuren. *Z Rechtsmed* 83: 77–80
9. Goenechea S, Kobbe K, Goebel K-J (1980) Verhalten von 2'-Hydroxymethyl-methaqualon-Glucuronid bei der Spaltung mit Salzsäure. *Z Rechtsmed* 85: 41–44
10. Goenechea S, Wessling W, Goebel K-J (1983) Studies on the cleavage of glucuronides of some major metabolites of methaqualone with hydrochloric acid. *Fresenius Z Anal Chem* 315: 359–360
11. Kamm G, Kelm R (1969) Quantitativer Nachweis von 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on im Plasma bei einmaliger und längerer Verabreichung. *Arzneimittelforsch* 19: 1659–1662
12. Kigasawa K, Shimizu H, Ohkubo K, Shoji R (1976) Decomposition and stabilization of drugs. XVII. Kinetic studies on the hydration of pentazocine in aqueous acidic media. *Yakugaku Zasshi* 96: 1342–1347
13. Langer M (1985) Synthese der Glucuronsäuredervate von 2-Phenylpropan-1-ol, 2-Phenyl-propan-2-ol und Pentazocin und Bestimmung ihrer Hydrolyseraten bei der Spaltung mit Salzsäure. *Diss Bonn*
14. Pittmann KE (1970) Human metabolism of orally administered Pentazocine. *Biochem Pharmacol* 19: 1833–1836
15. Reid RW, Gerbeck CM (1981) Detection of Pentazocine and Tripelennamine in Urine. *Clin Chem* 27: 10–13
16. Schütz HW (1971) Über den Nachweis von Morphin und Morphinderivaten im Urin. *Beitr Gerichtl Med* 28: 354–358
17. Stoner RE, Sullivan ML (1979) Detection of Pentazocine and Tripelennamine abuse. *Clin Chem* 25: 1097
18. Vlahov J, Snatzke G (1983) Über eine verbesserte Synthese von β -Glucosiduronsäure-Derivaten. *Liebigs Ann Chem* 570–574
19. Yoshimura H, Oguri K, Tsukamoto H (1968) Metabolism of drugs. LX. The synthesis of codeine and morphine glucuronides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 16: 2114–2119

Eingegangen am 10. Juli 1985