

CHROM. 13,701

Note

pH-Gradient-Dünnschicht-Chromatographie von Benzodiazepinen

EGON STAHL* und J. MÜLLER

Pharmakognosie und Analytische Phytochemie, Universität des Saarlandes, D-6600 Saarbrücken (B.R.D.)

(Eingegangen am 3. Februar 1981)

Die Literatur über Benzodiazepine ist deren Bedeutung entsprechend recht umfangreich. Sie wird in mehreren Übersichtsartikeln zusammenfassend dargestellt^{1–3}. Dabei findet die Chromatographie bei verschiedenen pH-Werten nur wenig Berücksichtigung, obwohl die Verbindungen ein pH-abhängiges Verhalten erwarten lassen.

Im Rahmen unserer Arbeiten mit der Gradient-Dünnschicht-Chromatographie (Gradient-DC)^{4–10} erschien es uns deshalb sinnvoll, die Trennmöglichkeiten von Benzodiazepinen auf pH-Gradient-Schichten zu untersuchen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Geräte

Gradient-DC-Streicher 85 (neues Modell; Desaga, Heidelberg, B.R.D.) mit nivellierbarem Streichtisch für fünf Platten 20 × 20 cm.

Prüfung des Streichgerätes auf Dichtigkeit

In den Gradient-DC-Streicher 85 wird die Diagonaltrennwand fest eingesetzt und das Gerät auf die Startplatte gestellt. Dann füllt man eine der beiden Trogkammern mit ca. 50 cm³ Wasser in einem Zug und beobachtet den Wasserdurchtritt in die andere Kammer. Bei funktionstüchtigen Geräten sollte eine Dichtigkeit für einige Sekunden gegeben sein.

Herstellung der pH-Gradient-Schichten

In zwei 100-cm³ Erlenmeyerkolben werden je 18.5 g TLC-Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, Darmstadt, B.R.D.) eingewogen. Aus Büretten misst man dann jeweils 50 cm³ 0.5 N Schwefelsäure und 0.5 N Natronlauge ab und gibt sie dem entsprechenden Kieselgel zu. Die Kolben werden verschlossen und unter Festhalten der Stopfen ca. 10 sec intensiv geschüttelt. Anschliessend werden die beiden Suspensionen gleichzeitig in je einen Teilerraum des Gradientstreichgerätes eingebracht und die Flüssigkeitsoberflächen mit je einem Spatel nivelliert. Danach zieht man die Trennwand des Teilers heraus und setzt die Mischwelle mit Hilfe der Kunststoffklammer ein. Mittels des Motorantriebes wird dann ca. 15 sec nur in einer Richtung gemischt und danach die Verbindung zum Motor gelöst. Dann wird der Hebel des Streichgerätes um 90° (Belüftung!) nach oben gedreht und die Masse gleichmässig auf die fünf DC-Platten

ausgestrichen. Die Schichten werden bis zum Verschwinden des wässrigen Glanzes auf dem nivellierten Streichtisch gelassen, danach *ca.* 15 min im Warmluftstrom vorgetrocknet und anschliessend 30 min auf 110°C erhitzt.

Herstellung von uniformen Kieselgelschichten

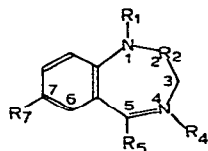
Verwendung des gleichen Streichgerätes, jedoch ohne Diagonalteiler und Mischwelle. In einem 250-cm³ Erlenmeyerkolben werden 30 g TLC-Kieselgel 60 GF₂₅₄ mit 80 cm³ demineralisiertem Wasser gemischt und in üblicher Weise ausgestrichen und getrocknet.

Substanzen

Die verwendeten Benzodiazepine sind in Tabelle I aufgeführt. Sie wurden alle von der Firma Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

TABELLE I

STRUKTUREN DER UNTERSUCHTEN BENZODIAZEPINE



Benzodiazepine	R ₁	R ₂	R ₄	R ₅	R ₇
Medazepam	-CH ₃	-CH ₂ -	-		-Cl
Flunitrazepam	-CH ₃		-		-NO ₂
Diazepam	-CH ₃		-		-Cl
Clonazepam	-H		-		-NO ₂
Nitrazepam	-H		-		-NO ₂
Flurazepam	-CH ₂ -CH ₂ - N(C ₂ H ₅) ₂		-		-Cl
Chlordiazepoxid	-		→O		-Cl

Untersuchungslösung

Es wurde eine frisch bereitete 0.1 %ige Lösung der Benzodiazepine in Toluene verwendet, wobei zur vollständigen Auflösung bis zu einem Gehalt von etwa 1 % (v/v) Methanol zugesetzt wurde. Zu Vergleichszwecken dienten ebenfalls 0.1 %ige Lösun-

gen der Einzelsubstanzen im gleichen Lösungsmittel. Zur Chromatographie im Verlauf des Gradienten wurde eine ältere Lösung verwendet, die schon Zersetzungsprodukte enthielt.

Auftragen

0.1 cm³ der Probelösung wurden mit dem Desaga Autoliner 75 als ca. 17 cm langes, schmales Startband aufgetragen, entweder quer zum Gradient oder in der Richtung des Gradienten. Von den Lösungen der Einzelsubstanzen wurden je 2 mm³ am alkalischen Ende des Startbandes punktförmig aufgetragen. (Nicht alle auf eine Schicht)

Chromatographiebedingungen

Luftfeuchtigkeit. Die Luftfeuchte wurde nicht speziell eingestellt, sie betrug 30–35 % rel.

Fliessmittel und Entwicklung. Bei der Chromatographie quer zum Gradient wurde als Fliessmittel Chloroform–Aceton (90:10) bei Kammersättigung verwendet, wobei zweimal über eine Laufstrecke von 10 cm entwickelt wurde. Die Chromatographie im Verlauf des Gradienten sowie die zum Vergleich durchgeführte Entwicklung auf einer uniformen, neutralen Kieselgelschicht wurden in der BN-Kammer unter Durchlaufbedingungen mit Toluene–Propanol-2 (90:10) als Fliessmittel durchgeführt. Die Zeit betrug 90 min, nachdem die Front eine Höhe von 18 cm erreicht hatte.

Detektion. Zur Detektion wurde die Schicht mit 8 N Schwefelsäure besprüht und die auftretenden Fluoreszenzen bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (365 nm) (Desaga HP-UVIS) beobachtet. Photographiert wurde mit UV- und Gelbfilter mit dem Film Agfaortho 25 professional.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fig. 1 zeigt das chromatographische Verhalten der Benzodiazepine bei verschiedenen pH-Werten. Die Auftragung des Gemisches und die Entwicklung erfolgten quer zum Gradient (T-Gradient-Technik)⁵. Zum Vergleich wurde am alkalischen Ende der Schicht das Gemisch noch einmal punktförmig aufgetragen. Man erkennt für alle Substanzen höhere R_F -Werte im alkalischen und niedrigere im sauren pH-Bereich. Dieses Verhalten ist typisch für basische Verbindungen. Die sich bei einer Protonierung im Säuren ergebende Polaritätszunahme macht sich im Chromatogramm in einer verringerten Wanderungsgeschwindigkeit bemerkbar. Die Reihenfolge dieser R_F -Wert-Abnahme beim Übergang vom basischen zum sauren Milieu entspricht in etwa der Reihenfolge der pK_a -Werte¹¹. Zuerst lagert Flurazepam aufgrund seiner basischen Seitenkette (R_1 in Tabelle I) ein Proton an. Als nächste Substanzen folgen Medazepam und Chlordiazepoxid. Die übrigen Benzodiazepine haben kleinere pK_a -Werte, dementsprechend liegt der Wendepunkt der Substanzzonen weiter im Säuren. Die Carbonylgruppe in 2-Stellung verhindert die Protonenaufnahme am N-1, das Protonierungszentrum liegt am zweiten Ringstickstoffatom in 4-Stellung¹².

Der pK_a -Wert selbst ist aus dem Chromatogramm nicht abzulesen, da für die Lage der Kurvenwendepunkte nicht allein die Säuredissoziationskonstanten, sondern auch die Adsorptions- bzw. Verteilungsgleichgewichte eine Rolle spielen. Flunitrazepam und Diazepam, welche unter den angewandten Bedingungen im alkalischen

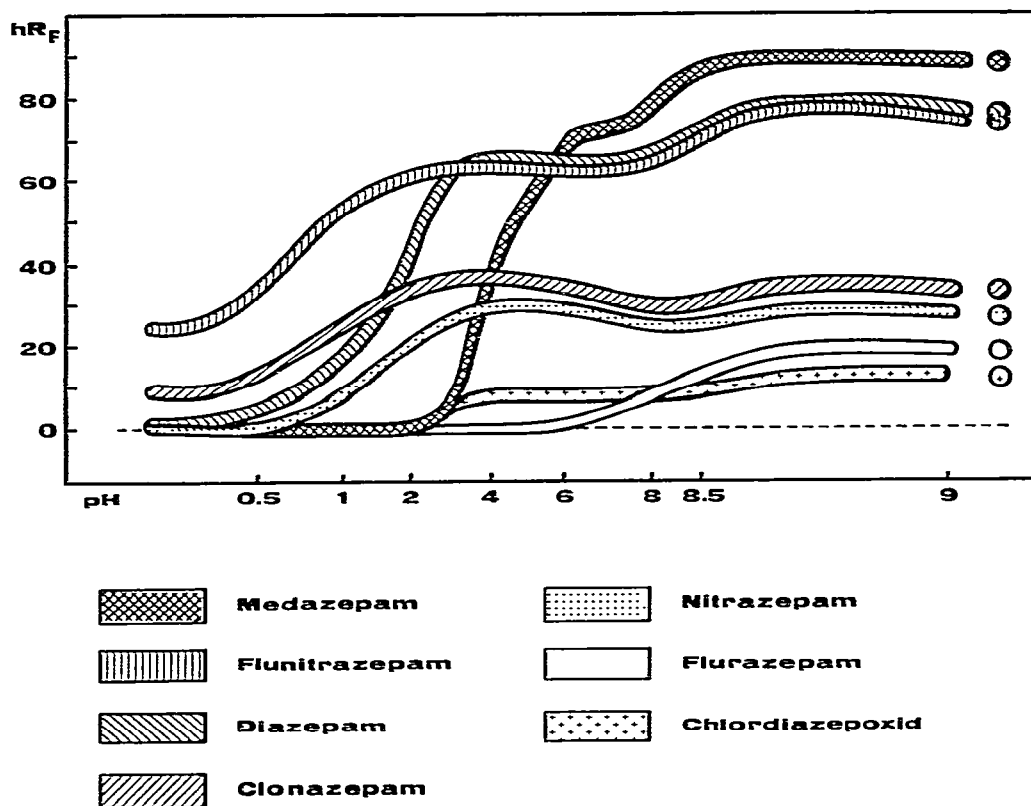


Fig. 1. Dünnschicht-Chromatogramm von Benzodiazepinen im pH-T-Gradient.

Milieu nicht getrennt werden, haben im sauren Bereich stark unterschiedliche R_F -Werte. Umgekehrt bleiben alle Benzodiazepine bis auf Flunitrazepam und Clonazepam im Sauren auf der Startlinie, während im Basischen ihre Trennung gelingt. So lässt sich mit Hilfe der pH-T-Gradient-Technik schnell erkennen, wo optimale Trennbedingungen vorliegen. Die Gradient-Chromatographie hat aber auch einen weitaus höheren Informationsgehalt als die übliche "punktförmige" Chromatographie auf uniformen Schichten. Denn die erhaltenen Kurven zeigen das chromatographische Verhalten der Substanzen über einen grösseren pH-Bereich übersichtlich und unmittelbar auf. Sie können deshalb bei der Identitätsprüfung von Benzodiazepinen eine wesentliche Hilfe darstellen. Auch die Erkennung von Verunreinigungen wird erleichtert, da es unwahrscheinlich ist, dass ihre R_F -Werte über den gesamten pH-Bereich identisch mit denen der Hauptsubstanzen sind.

Schliesslich wurde ein Benzodiazepingemisch, welches schon Zersetzungsprodukte enthielt, auf die basische Seite einer pH-Gradient-Schicht aufgetragen und in Richtung des sauren Bereichs chromatographiert. Man erhält eine Auftrennung in 14 Zonen (Fig. 2A), während im Vergleichschromatogramm (Fig. 2B), das die Auftrennung des Gemisches unter sonst gleichen Bedingungen auf einer normalen, uniformen Kieselgelschicht zeigt, nur 6 Zonen zu erkennen sind.

Im Gradient-Chromatogramm (Fig. 2A) sind die Substanzzonen teilweise zu

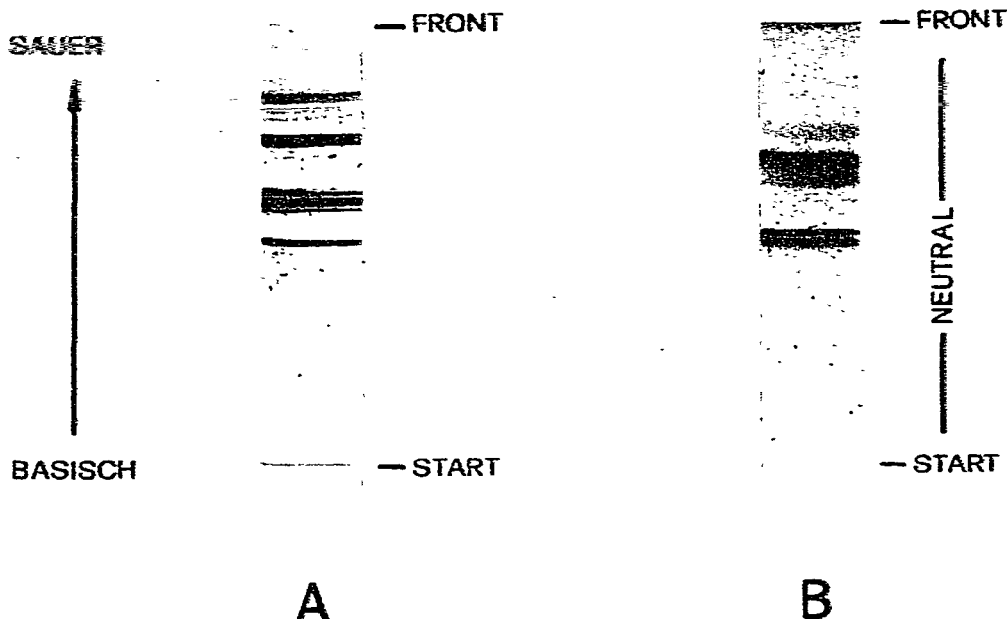


Fig. 2. Dünnschicht-Chromatogramme von Benzodiazepinen mit Zersetzungsprodukten. A: Chromatographiert wurde im pH-Gradient von basisch nach sauer. B: Chromatographiert wurde auf einer uniformen, neutralen Kieselgelschicht. Im Vergleich zu Fig. 2A tritt kein Fokussierungseffekt auf.

schmalen Bändern zusammengeschoben. Dieser Fokussierungseffekt ergibt sich bei Substanzen, deren Wanderungsgeschwindigkeit bei einem bestimmten pH-Wert drastisch abnimmt, so dass eine Konzentrierung der Substanz an dieser Stelle erfolgt. Dieser Fokussierungseffekt führt zu einer erheblichen Erniedrigung der Nachweisgrenze, was in der Spurenanalyse nützlich sein kann. Dies kann auch für die Lösung präparativer Probleme von Vorteil sein.

LITERATUR

- 1 D. M. Hailey, *J. Chromatogr.*, 98 (1974) 527.
- 2 J. M. Clifford and W. F. Smyth, *Analyst (London)*, 99 (1974) 241.
- 3 H. Schütz, *Benzodiazepines — Analytical Methods, Pharmacokinetics and Other Themes*, Editio Cantor, Verlag für Medizin und Naturwissenschaften, Aulendorf, in Vorbereitung.
- 4 E. Stahl, *Chem. Ing. Tech.*, 36 (1964) 941.
- 5 E. Stahl, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 3.
- 6 E. Stahl, *Proc. 6th Int. Congr. Clin. Chem., München*, 3 (1966) 63.
- 7 E. Stahl und E. Dumont, *Talanta*, 16 (1969) 657.
- 8 E. Stahl und J. Müller, *J. Chromatogr.*, 189 (1980) 293.
- 9 E. Stahl und J. Müller, *J. Liquid Chromatogr.*, 3 (1980) 775.
- 10 E. Stahl und J. Müller, *GIT Fachz. Lab.*, 24 (1980) 649.
- 11 C. D. Herzfeldt, *Pharm. Ztg.*, 125 (1980) 608.
- 12 E. Graf und M. El-Menshawey, *Pharm. Zeit.*, 6 (1977) 171.