

Zur Analytik von Flunitrazepam (Rohypnol)*, einem neuen Benzodiazepinderivat, unter besonderer Berücksichtigung der Metaboliten**

Siegfried Ebel¹ und Harald Schütz²

¹ Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität, Marbacher Weg 6, D-3550 Marburg

² Institut für Rechtsmedizin der Justus Liebig-Universität, Frankfurter Str. 58, D-6300 Gießen, Bundesrepublik Deutschland

Analytical Data of Flunitrazepam (Rohypnol), a New Benzodiazepine-Derivative, in Special Consideration of its Metabolites

Summary. The article describes analytical data (TLC, GLC, IR, UV and MS) of flunitrazepam, 7-amino-flunitrazepam, desmethylflunitrazepam, 3-hydroxyflunitrazepam, 7-amino-desmethyl-flunitrazepam and many other benzodiazepine-derivatives, especially aminobenzophenones. Also extraction from biological specimen is reported.

Key words: Analytical Data, Flunitrazepam – Flunitrazepam – Rohypnol

Zusammenfassung. In der Arbeit werden analytische Daten (DC, GLC, IR, UV, MS) von Flunitrazepam, 7-Aminoflunitrazepam, Nor-Flunitrazepam, 3-Hydroxyflunitrazepam, 7-Amino-nor-flunitrazepam und zahlreichen anderen Benzodiazepinen und Aminobenzophenonen mitgeteilt. Weiterhin wird über die Aufarbeitung biologischen Untersuchungsmaterials berichtet.

Schlüsselwörter: Analytik, Flunitrazepam – Flunitrazepam – Rohypnol

Mit Flunitrazepam (in Österreich und in der Schweiz im Handel, in der Bundesrepublik Deutschland z. Zt. noch in klinischer Erprobung) wurde ein neues Benzodiazepinderivat entwickelt, dem nach Sternbach (1971) eine ausgeprägte pharmakologische Wirksamkeit zukommt.

* 5-(o-Fluorphenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on

** Herrn Professor Dr. Dotzauer zum 65. Geburtstag gewidmet

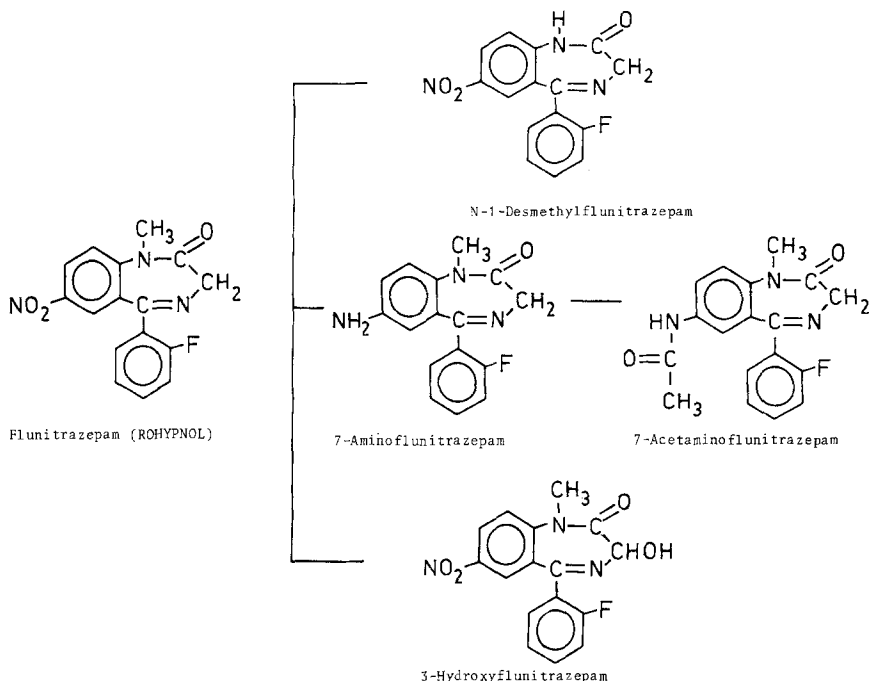


Abb. 1. Schematische Darstellung der Biotransformation von Flunitrazepam

Nach Angaben des Herstellers besitzt Flunitrazepam besonders starke sedative und hypnotische Komponenten im Wirkungsspektrum, während anxiolytische, muskelrelaxierende und antikonvulsive Eigenschaften in den Hintergrund treten.

Wie alle Benzodiazepine kann Flunitrazepam zusammen mit anderen zentral wirkenden Pharmaka zu Wirkungsverstärkungen führen. Insbesondere die individuelle Reaktion mit Alkohol dürfte vom verkehrsmedizinischen Standpunkt aus betrachtet von Interesse sein. Darüber hinaus soll es nach der Verabreichung von Flunitrazepam wiederholt zum Erscheinungsbild der anterograden Amnesie gekommen sein.

Bisher liegen vor allem Veröffentlichungen zum gaschromatographischen Nachweis von Flunitrazepam vor (Cano et al. 1977, de Silva et al. 1974, 1976). Über die Biotransformation berichten Kaplan et al. 1974.

In der vorliegenden Arbeit sollen chromatographische und spektroskopische Daten der Metaboliten sowie Untersuchungen zum Nachweis und zur Gewinnung aus biologischem Material mitgeteilt werden. Bezüglich allgemeiner Daten (z. B. Löslichkeit, Schmelzpunkt, Toxizität, Vorproben) vgl. Schütz (1978).

Biotransformation

Nach Cano et al. (1977) ist für die Biotransformation von Flunitrazepam das in Abb. 1 wiedergegebene Schema gültig, das in vielen Einzelheiten Analogien zum Stoffwechsel von Clonazepam (Eschenhof 1973; Pfeifer 1975) und Nitrazepam (Beyer 1971, 1975; Beyer u. Sadée 1969, Pfeifer 1975, Pribilla 1965, Rieder 1965, 1973, Sawada u. Shinohara 1978) aufweist.

*Dünnschichtchromatographische Daten***Tabelle 1.** DC der Metaboliten (incl. Flunitrazepam und Nitrazepam)

Substanz:	Fließmittel:	I ^a	II ^b
Flunitrazepam		0,68	0,82
Nor-Flunitrazepam		0,43	0,66
7-Aminoflunitrazepam		0,25	0,52
7-Acetamidoflunitrazepam		0,16	0,38
3-Hydroxyflunitrazepam		0,47	0,56
7-Amino-nor-flunitrazepam		0,13	0,43
Nitrazepam		0,43	0,70

^a Chloroform/Aceton (80+20; v/v)

^b Benzol/i-Propanol/Ammoniak konz. (80+20+1; v/v/v)

Tabelle 2. DC der bei einer sauren Hydrolyse entstehenden Aminobenzophenonderivate^{a,b}

Substanz	Fließmittel:	III ^c	IV ^d
2-Amino-5-nitrobenzophenon (z. B. aus Nitrazepam)		0,17	0,80
2-Amino-2'-chlor-5-nitrobenzophenon (z. B. aus Clonazepam)		0,17	0,82
2'-Fluor-2-methylamino-5-nitrobenzophenon (z. B. aus Flunitrazepam)		0,43	0,92
2-Amino-2'-fluor-5-nitrobenzophenon (z. B. aus Nor-Flunitrazepam)		0,23	0,75
5-Amino-2'-fluor-2-methylaminobenzophenon (z. B. aus 7-Aminoflunitrazepam)		0,00	0,20
2,5-Diamino-2'-fluorbenzophenon (z. B. aus 7-Amino-nor-flunitrazepam)		0,00	0,08
2'-Chlor-2,5-diaminobenzophenon (z. B. aus 7-Aminoclonazepam)		0,00	0,48
2-Amino-5-chlorbenzophenon (z. B. aus Chlordiazepoxid, Diazepam oder Oxazepam)		0,45	0,88
2-Amino-2', 5-dichlorbenzophenon (z. B. aus Lorazepam)		0,52	0,90
5-Chlor-2-methylaminobenzophenon (z. B. aus Diazepam)		0,70	0,96
5-Chlor-2-cyclopropylmethylaminobenzophenon (z. B. aus Prazepam)		0,85	0,99

^a in 10%iger salzsaurer Lösung etwa 15 min auf dem sied. Wasserbad erhitzen, danach neutralisieren und bei alk. pH-Wert mit Äthylacetat extrahieren

^b Nachweis weiterer Aminobenzophenone s. Ebel u. Schütz (1977)

^c Benzol

^d Chloroform/Aceton (90+10; v/v)

Hauptmetabolisierungsschritte sind demnach:

- a) Desalkylierung in N-1-Stellung
- b) Reduktion der 7-Nitrogruppe und evtl. Acetylierung des Amins.
- c) Hydroxylierung in 3-Stellung und Konjugatbildung.

Gaschromatographische Daten

Gerät: Varian Aerograph Series 2100 mit FID, OT 280°C, ET 280°C, FID-Zuleitung 280°C;
Säule: 1,5 m Glas, 2 mm ID, Chromosorb G, AW/DMCS (80/100 mesh), Trägergas: N₂

Tabelle 3

Substanz	Retentionsindizes ^a	
	3% SE-30	3% OV-17
Flunitrazepam	2652	3248
7-Aminoflunitrazepam	2695	3363
Nor-Flunitrazepam	2740	3390
7-Amino-nor-flunitrazepam	2859	3515
3-Hydroxyflunitrazepam	Zers.	Zers.

^a zur Berechnung der Retentionsindizes vgl. Berninger u. Möller (1977), Kaiser (1970), Kovats (1958) und Post (1976)

*UV-Spektren (in Äthanol abs. gemessen)***Tabelle 4**

Substanz	UV-Spektren ^a
Flunitrazepam	237 (min)/ <u>253 (max)</u> /287 (min)/311 (max)
7-Aminoflunitrazepam	<u>243 (max)</u> /312 (min)/352 (max)
Nor-Flunitrazepam	237 (min)/ <u>252 (max)</u> /285 (min)/310 (max)
7-Amino-nor-flunitrazepam	<u>242 (max)</u> /314 (min)/354 (max)
3-Hydroxyflunitrazepam	236 (min)/ <u>252 (max)</u> /288 (min)/312 (max)
7-Acetamidoflunitrazepam	<u>245 (max)</u> /300 (min)/325 (max)

^a Maxima mit (max), Minima mit (min) gekennzeichnet, Hauptmaxima unterstrichen, Unicam SP 8000, Eichung mit Holmium.

Flunitrazepam wird, wie alle anderen in 7-Position nitrosubstituierten Benzodiazepine, praktisch vollständig metabolisiert, was zur Folge hat, daß renal allenfalls Spuren des unveränderten Wirkstoffes ausgeschieden werden. Hauptmetaboliten sind Nor-Flunitrazepam und insbesondere 7-Aminoflunitrazepam. Die Hydroxylierung in 3-Stellung tritt, verglichen mit der Biotransformation von Diazepam oder Prazepam, deutlich in den Hintergrund. Über die Präparation der einzelnen Metaboliten soll gesondert berichtet werden (Ebel und Schütz, 1978). Nachstehend werden zunächst die wichtigsten chromatographischen und spektroskopischen Daten mitgeteilt.

In allen Fällen aufsteigende DC, keine besondere Aktivierung der DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (Art Nr. 5715 Merck), Kammersättigung.

Detektion: relativ unspezifisch anhand der Fluoreszenzminderung, prim. Aminobenzophenone nach Bratton u. Marshall (1939), genaue Arbeitsvorschrift s. z. B. Ebel u. Schütz (1977), sek. Aminobenzophenone nach Desalkylierung (Ebel et al. 1977).

Im Hinblick auf die unterschiedliche Polarität der Aminobenzophenone ist eine Verwendung beider Fließmittel (III und IV) zu empfehlen, da nur so eine befriedigende Differenzierung möglich ist.

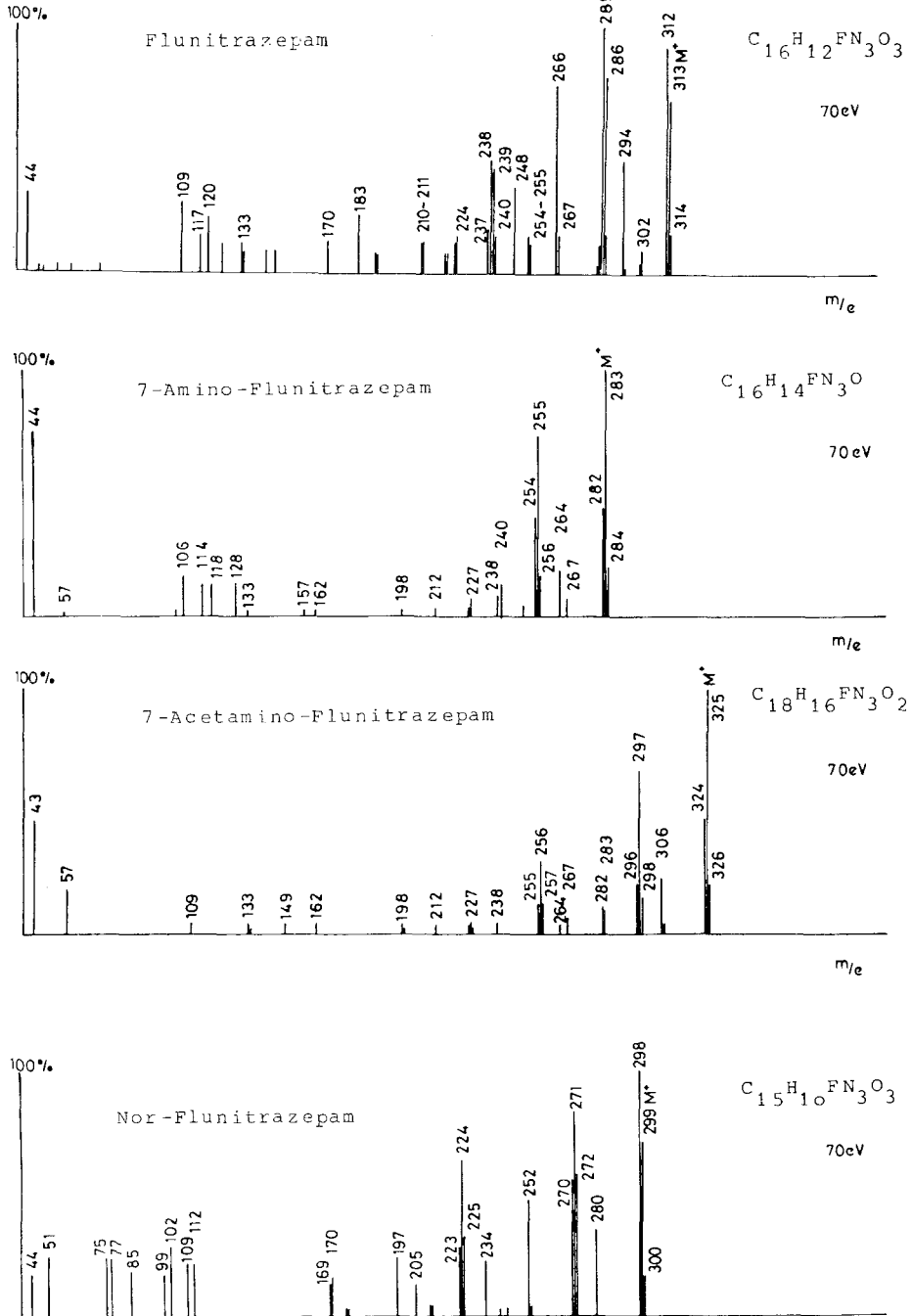


Abb. 2. Massenspektren von Flunitrazepam, 7-Aminoflunitrazepam, 7-Acetaminoflunitrazepam, Nor-Flunitrazepam (Direkteinlaß, 70 eV)

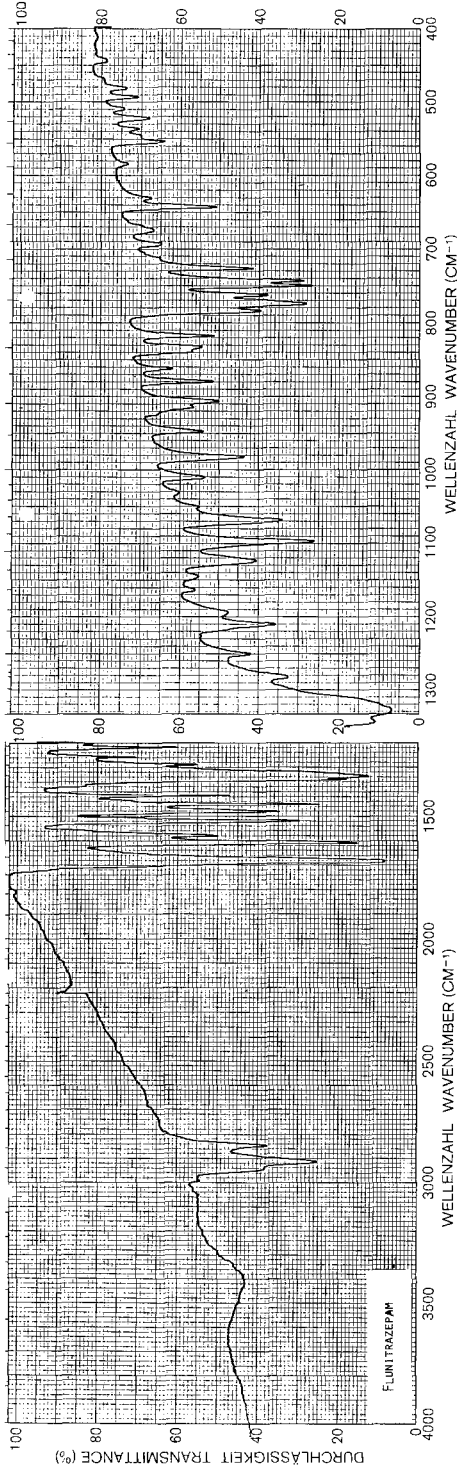


Abb. 3. IR-Spektren von Flunitrazepam, 7-Aminoflunitrazepam, 7-Acetamidoflunitrazepam, Nor-Flunitrazepam und 2-Methylamino-5-nitro-2'-fluorobenzophenon

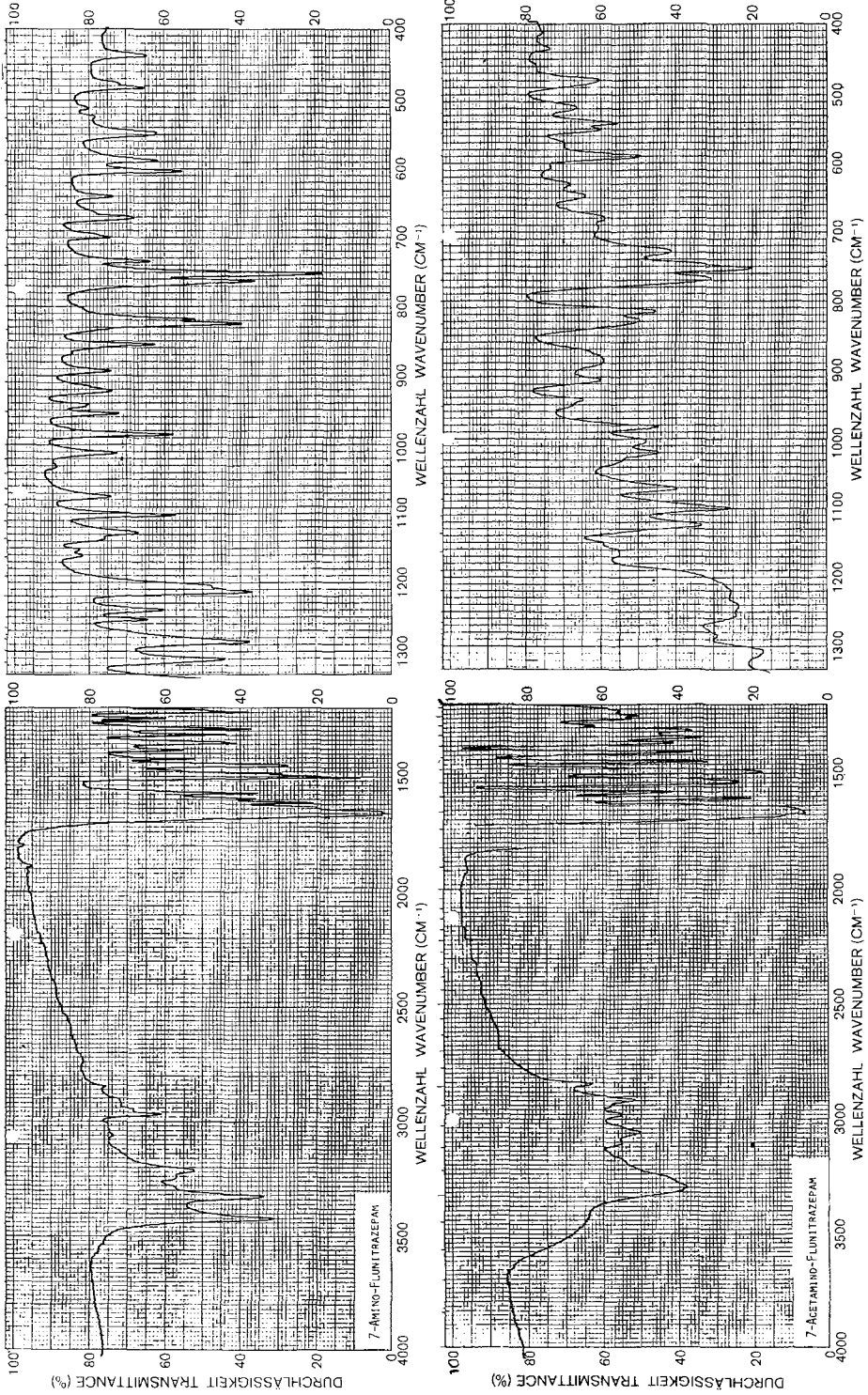
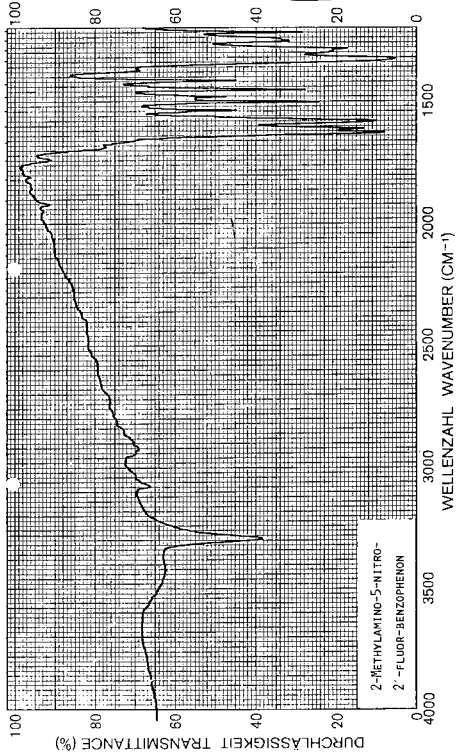
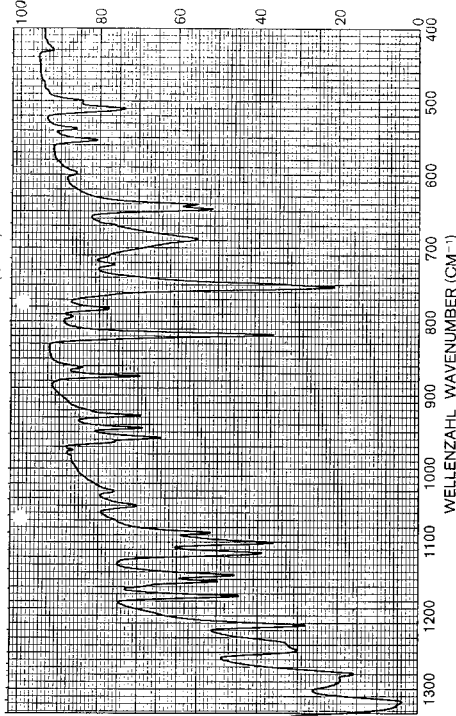
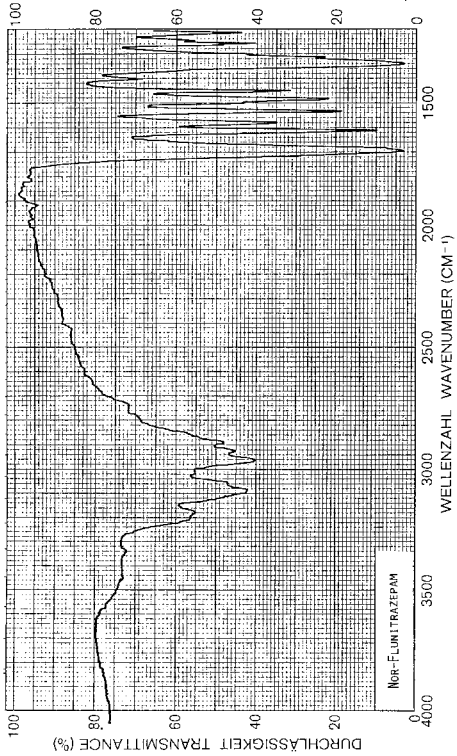
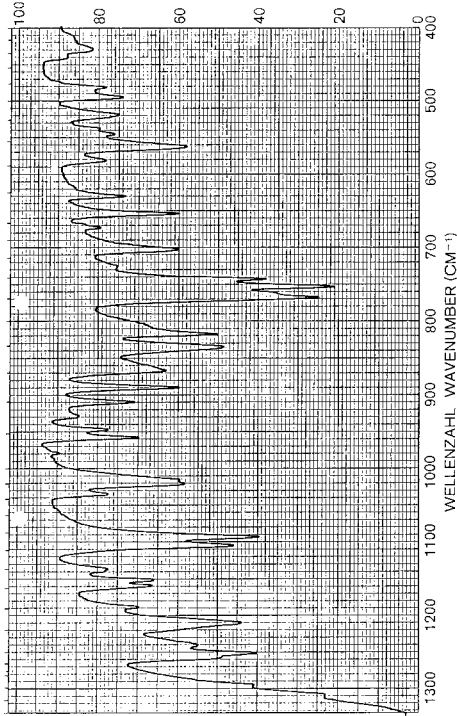


Abb. 3.



Massenspektren

Gerät: Varian Mat 101 (Direkteinlaß)

Ionenquellentemperaturen:	(°C)
Flunitrazepam	76
7-Aminoflunitrazepam	78
Nor-Flunitrazepam	120
7-Amino-nor-flunitrazepam	144
3-Hydroxyflunitrazepam	88
7-Acetamidoflunitrazepam	164

Die Massenspektren sind in Abbildung 2 wiedergegeben.

IR-Spektren

Gerät: Perkin-Elmer 337/KBr-Preßtechnik (1 mg/300 mg KBr)

Die IR-Spektren sind in Abb. 3 wiedergegeben.

Extraktion aus biologischem Material

Zur Untersuchung gelangte der Harn von Patienten, denen 2,0 mg Flunitrazepam i. V. im Zusammenhang mit chirurgischen Maßnahmen einmalig verabreicht wurden. Hierbei wurden die ersten 600 ml Harn gesammelt.

Die Harnproben wurden zunächst zur Konjugatspaltung bei pH 5,5 und 37°C mit β -Glukuronidase 30 U/ml/Arylsulfatase 20 U/ml (Fa. Merck/L'industrie biologique francaise S. A., Genevillers, Seine) inkubiert (Zeitdauer: Etwa 18 Stunden; Konzentration: 0,5–1,0 Vol%).

Die Extraktion der Metaboliten erfolgte bei pH 10–11 mit Essigsäureäthylester. Die vereinigten Essigesterextrakte wurden im Vakuumrotationsverdampfer eingengt und anschließend untersucht.

Ergebnisse

Die Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse:

- a) Flunitrazepam konnte allenfalls in unbedeutenden Spuren nachgewiesen werden.
- b) Aufgrund unserer Untersuchungen ist 7-Aminoflunitrazepam als Hauptmetabolit anzusehen.
- c) Nebenmetaboliten sind: Nor-Flunitrazepam, 3-Hydroxyflunitrazepam und 7-Acetamidoflunitrazepam (letzteres wurde ebenfalls lediglich in Spuren ausgeschieden). Im Rahmen eines üblichen screening-Tests über die bei der sauren Hydrolyse entstandenen Aminobenzophenonderivate (Einzelheiten s. Geldmacher – von Mallinckrodt 1975 u. 1976 sowie Ebel u. Schütz 1977) konnten folgende Substanzen mit Hilfe der Reaktion nach Bratton u. Marshall (1939) bei entsprechenden Rf-Werten angefärbt werden:

5-Amino-2'-fluor-2-methylaminobenzophenon
(aus 7-Aminoflunitrazepam)

2-Amino-2'-fluor-5-nitrobenzophenon (in Spuren)
(aus Nor-Flunitrazepam).

Untersuchungen zur Pharmakokinetik und quantitativen Bestimmung sind vorgesehen und sollen Gegenstand einer späteren Publikation werden.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit.

Unser besonderer Dank gilt weiterhin der Fa. Hoffmann-La Roche für die freundliche Überlassung von Substanz- und Schriftmaterial sowie die laufende Förderung unserer Untersuchungen

Literatur

- Bäumler, J., Brandenberger, H.: Einsatz der kombinierten Spektroskopie in der toxikologischen Analytik. *Z. Rechtsmedizin* 76, 159 (1975)
- Berninger, H., Möller, M. R.: Retentionsindices zur gaschromatographischen Identifizierung von Arzneimitteln. *Arch. Toxicol.* 37, 295 (1977)
- Beyer, K.-H.: Die Biotransformation der Benzodiazepinderivate. *Dtsch. Apoth.-Ztg.* 111, 1503 (1971)
- Beyer, K.-H.: In: *Index der Psychopharmaka (Roche)* – p. 190–225, Basel: Hoffmann-La Roche 1971
- Beyer, K.-H.: Biotransformation der Arzneimittel. S. 228, Stuttgart: Wiss. Verlagsges. 1975
- Beyer, K.-H., Sadée, W.: Synthese und Analytik möglicher Nitrazepam-Metaboliten. *Arch. Pharmaz.* 302, 152 (1969)
- Bratton, A. C., Marshall, E. K. jr.: A New Coupling Component for Sulfanilamide Determination. *J. biol. Chem.* 128, 537 (1939)
- Cano, J. P., Guinrand, J., Aubert, C., Viala, A.: Determination of Flunitrazepam, Desmethyl-flunitrazepam und Clonazepam in Plasma by Gas Liquid Chromatography with an Internal Standard. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 27, 338 (1977)
- Ebel, S., Langer, B.-M., Schütz, H.: Verbesserte Nachweis für N-1-alkylierte 1,4-Benzodiazepine durch photolytische Abspaltung der N-Alkylgruppe. *Mikrochimica Acta (Wien)* 1977 II, 261
- Ebel, S., Schütz, H.: Untersuchungen zum Nachweis von Clonazepam und Nitrazepam. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 27, 325 (1977)
- Ebel, S., Schütz, H.: Dünnschichtchromatographischer Nachweis wichtiger Pharmaka über primäre aromatische Aminogruppen als Schlüsselfragment. *Dtsch. Apoth.-Ztg.* 117, 1605 (1977)
- Ebel, S.: *Handbuch der Arzneimittel-Analytik*. Weinheim: Verlag Chemie 1977
- Eschenhof, E.: Untersuchungen über das Schicksal des Antikonvulsivums Clonazepam im Organismus der Ratte, des Hundes und des Menschen. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 23, 390 (1973)
- Geldmacher – von Mallinckrodt, M.: In: *Gerichtliche Medizin Bd. 2*, Hrsg. B. Mueller, Berlin–Heidelberg–New York: Springer 1975
- Geldmacher – von Mallinckrodt, M.: *Einfache Untersuchungen auf Gifte im klinisch-chemischen Laboratorium*. Stuttgart: Thieme 1976
- Kaiser, R. E.: Retentionsdaten, Retentionsindices in der Gaschromatographie. *Chromatographia* 3, 134 (1970)
- Kaiser, R. E.: Rechner in der Gas-Chromatographie. I. Präzise Retentionsindizes aus Brutto-retentionszeiten. *Chromatographia* 7, 251 (1974)
- Kaplan, S. A., Alexander, K., Jack, M. L., Puglisi, C. V., Silva, J. A. F. de, Lee, T. L., Weinfeld, R. E.: Pharmacokinetic Profiles of Clonazepam in Dog and Humans and of Flunitrazepam in Dog. *J. pharmac. Sci.* 63, 527 (1974)
- Kováts, E.: Gas-chromatographische Charakterisierung organ. Verbindungen. Teil I: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. chim. Acta* 41, 1915 (1958)
- Pfeifer, S.: *Biotransformation von Arzneimitteln*, Bd. 1, S. 87, 291. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit 1975
- Pribilla, O.: Zum chemischen Nachweis von 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1, 4-benzodiazepin-2-on. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 15, 1148 (1965)
- Post, D.: Gaschromatographischer Beitrag zur Analytik pyridinchromophorer und phenylchromophorer Basen. *Beitr. gerichtl. Med.* 34, 219 (1976)

- Rieder, J.: Methoden zur Bestimmung von Nitrazepam und seinen Hauptmetaboliten in biologischen Proben und Ergebnisse von Versuchen über die Pharmakokinetik und den Metabolismus der Substanz bei Mensch und Ratte. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* **15**, 1134 (1965)
- Rieder, J.: Plasma Levels and Derived Pharmacokinetic Characteristics of Unchanged Nitrazepam in Man. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* **23**, 212 (1973)
- Rieder, J.: In: *The Benzodiazepines*. S. Garattini, E. Mussini, L. O. Randall, (Eds.), pp. 99–127, New York: Raven Press 1973
- Sawada, H., Shinohara, K.: On the Urinary Excretion of Nitrazepam and Its Metabolites. *Arch. Toxicol.* **28**, 214 (1971)
- Schütz, H.: In: *Gadamers Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte*. Bd. I, 2 (1. Hälfte), Hrsg. Fr. R. Preuß, Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht 1978
- Silva, J. A. F. de, Bekersky, I.: Determination of clonazepam and flunitrazepam in blood by electron-capture gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **99**, 447 (1974)
- Silva, J. A. F. de, Bekersky, I., Puglisi, C. V., Brooks, M. A., Weinfeld, R. E.: Determination of 1,4-Benzodiazepines and -diazepin-2-ones in blood by electron-capture gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.* **48**, 10 (1976)
- Silva, J. A. F. de, Puglisi, C. V., Munno, N.: Determination of Clonazepam and Flunitrazepam in Blood and Urine by Electron-Capture-GLC. *J. pharmac. Sci.* **63**, 520 (1974)
- Sternbach, L. H.: 1,4-Benzodiazepine. *Chemie und Betrachtungen zur Beziehung zwischen Struktur und Wirkung*. *Angew. Chem.* **83**, 70 (1971)/*Angew. Chem. Int. Ed.* **10**, 34 (1971)

Eingegangen am 11. Januar 1978