

## **Gaschromatographische Daten von 19 Hydrolyse-derivaten aus 12 wichtigen Benzodiazepinen und 17 Hauptmetaboliten\***

H. Schütz und Vera Westenberger

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

### **GLC-Data of 19 Hydrolysis-Derivatives Rised from 12 Important Benzodiazepines and 17 Main-Metabolites**

**Summary.** Analytical investigations of extracts after acid hydrolysis are in use especially considering benzodiazepine screening methods.

The article describes the gas-chromatographic data of 19 hydrolysis-derivatives which are formed by hydrolysis of 12 important 1,4- and 1,5- benzodiazepines and 17 main metabolites.

**Key words:** Benzodiazepines – Gas-chromatographic data, Benzophenones.

**Zusammenfassung.** Analytische Untersuchungen von Extrakten, die nach einer sauren Hydrolyse gewonnen wurden, sind besonders im Rahmen der Screening-Analyse der Benzodiazepine üblich.

In der Arbeit werden gaschromatographische Daten von insgesamt 19 Hydrolyse-derivaten (meist Aminobenzophenonen) mitgeteilt, die aus 12 wichtigen 1,4- bzw. 1,5-Benzodiazepinen sowie 17 Hauptmetaboliten entstehen.

**Schlüsselwörter:** Benzodiazepine – gaschromatographische Daten – Benzophenone.

Seit der Einführung der Benzodiazepine in den frühen sechziger Jahren nimmt ihr Anteil im Spektrum der analytischen Arbeit ständig zu. Aufgrund neuerer Statistiken stehen Benzodiazepine der Häufigkeit nach bereits an dritter Stelle (hinter Barbituraten und Bromcarbamiden). Somit kommt auch der Analytik dieser Wirkstoffklasse eine ständig wachsende Bedeutung zu.

Im Rahmen eines gängigen Screening-Tests wird das Untersuchungsmaterial (z. B. Harnprobe) sauer hydrolysiert, wobei aus den meisten Benzodiazepinen und ihren Metaboliten verschiedenartig substituierte Aminobenzophenonderivate entstehen.

---

\* Wir danken der Firma Hoffmann-La Roche, Basel (Schweiz), für die Förderung dieser Arbeit

Tabelle I.

GLC-Data / GLC-Daten		220°C		250°C		280°C							
Nr.	Hydrolysis Product (Origin)	Ret. Time (s) SE-30/OV-17	Ret. Index SE-30/OV-17	Ret. Time (s) SE-30/OV-17	Ret. Index SE-30/OV-17	Ret. Time (s) SE-30/OV-17	Ret. Index SE-30/OV-17						
1	2-Amino-5-chlor-benzo- phenone (Chlordiazepoxide, Oxazepam, (Chlorazepate and metabolites)	86	2045	2455	2080	2515	21	47	2125	2585			
2	2-Methylamino-5-chlor- benzophenone (Diazepam, Temazepam and metabolites)	95	236	2105	2490	247	91	2155	2535	20	43	2105	2570
3	2-Amino-5-nitro-benzo- phenone (Nitrazepam)	220	803	2380	2875	98	297	2435	2940	47	141	2475	2990
4	2,5-Diamino-benzophenone (7-Amino-Nitrazepam, (7-Acetamido-Nitrazepam)	127	367	2170	2605	50	156	2225	2740	30	77	2300	2800
5	2-Amino-5,2'-dichlor- benzophenone (Lorazepam and metabolites)	122	345	2195	2600	57	135	2240	2670	50	72	2480	2680
6	2-Cyclopropyl-methylamino- 5-chlor-benzophenone (Prazepam and metabolites)	215	539	2370	2750	85	185	2400	2805	43	86	2450	2855
7	2-Amino-5-nitro-2'- chlor-benzophenone (Clonazepam)	-	-	-	-	109	414	2540	3105	55	208	2550	3140

Tabelle 1 (Fortsetzung)

8	2,5-Diamino-2'-chlor-benzophenone (7-Amino-Clonazepam, 7-Acetamido-Clonazepam)	218	765	2335	2815	77	265	2355	2890	--	--	--	--
9	2-Diethylamino-ethyl-amino-5-chlor-2'-fluor-benzophenone (Flurazepam)	--	--	--	--	126	278	2555	2930	51	97	2560	2940
10	2-Amino-5-chlor-2'-fluor-benzophenone (N-1-Desalkyl-Flurazepam)	86	230	2045	2435	38	78	2090	2490	--	--	--	--
11	2-Hydroxyethylamino-5-chlor-2'-fluor-benzophenone (N-1-Hydroxyethyl-Flurazepam)	265	--	2425	--	99	244	2490	2905	46	105	2500	2955
12	2-(2-Amino-5-brom-benzoyl)-pyridine (Bromazepam and metabolites)	142	425	2275	2735	59	175	2260	2785	--	--	--	--
13	2-Methylamino-5-nitro-2'-fluor-benzophenone (Flunitrazepam)	232	792	2385	2860	104	276	2435	2910	48	133	2470	2940
14	2-Amino-5-nitro-2'-fluor-benzophenone (Nor-Flunitrazepam)	206	769	2345	2825	87	282	2380	2885	--	--	--	--
15	2-Methylamino-5-amino-2'-fluor-benzophenone (7-Amino-Flunitrazepam, 7-Acetamido-Flunitrazepam)	--	--	--	--	187	714	2705	3270	70	230	2700	3295

Tabelle 1 (Fortsetzung)

16	2,5-Diamino-2'-fluor- benzophenone (7-Amino-Nor-Flunitra- zepam)	117	394	2150	2650	61	157	2225	2715	83	112	2380	2745
17	2-Amino-3-hydroxy-5- chlor-benzophenone (Metabolites)	217	—	2360	—	87	230	2400	2840	38	112	2380	2870
18	2-Amino-5-chlor-di- phenylamine (Nor-Clobazam)	85	244	2075	2475	42	113	2080	2535	—	—	—	—
19	2-Methylamino-5-chlor- diphenylamine (Clobazam)	137	366	2230	2600	66	152	2270	2660	—	—	—	—

Diese werden extrahiert und entweder dünn-schichtchromatographisch oder gaschromatographisch untersucht.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es sein, eine zusammenfassende und möglichst vollständige Datensammlung der Hydrolyse-derivate zur Verfügung zu stellen, die insbesondere auch die neuesten Benzodiazepin-entwicklungen sowie die Haupt-metaboliten erfaßt.

Bezüglich anderer Nachweismethoden, vor allem auch zur Erfassung der unhydrolysierten Benzodiazepine, sei auf das umfangreiche Schrifttum verwiesen (4–20).

## Methodik

### a) Hydrolyse

Die Aminobenzophenone wurden in üblicher Weise (1,2) durch salzsaure Hydrolyse der Benzodiazepine gewonnen, (etwa 10%ige Salzsäure, 95°C, kontinuierliche Kontrolle des Reaktionsablaufes durch vergleichende DC bis zum weitgehend quantitativen Umsatz).

### b) Gaschromatographische Untersuchungen

Gerät: VARIAN Aerograph Series 2100 mit FID und Integrator. Säule: 1,5 m Glas, 2 mm ID, Chromosorb G, AW/DMCS, 80/100 mesh; Trägergas Stickstoff (ca. 15 ml/min<sup>-1</sup>). 3% SE-30 bzw. OV-17 (Abgaben hierzu sowie zur Temperatur befinden sich in der Tabelle).

Die Berechnung der Retentionsindizes erfolgte mit Hilfe der nachstehenden Formel (vgl. auch 21–25):

$$I_x = (I_n - I_y) \left[ \log \frac{t_{msx} - t_m}{t_{msv} - t_m} : \log \frac{t_{msn} - t_m}{t_{msv} - t_m} \right] + I_y,$$

wobei  $I_x$  = unbekannter Index,  
 $I_y$  = Index der Bezugssubstanz vor Peak X,  
 $I_n$  = Index der Bezugssubstanz hinter Peak X,  
 $t_{sx}$  =  $t_{msx} - t_m$ , Nettoretentionszeit der Substanz X,  
 $t_{sv}$  bzw.  $t_{sn}$  sind die entsprechenden Nettoretentionszeiten der Bezugssubstanzen  
 $t_{msx}$  = Bruttoretentionszeit der Substanz X (analog  $t_{msv}$  bzw.  $t_{msn}$ ),  
 $t_m$  = Totzeit.

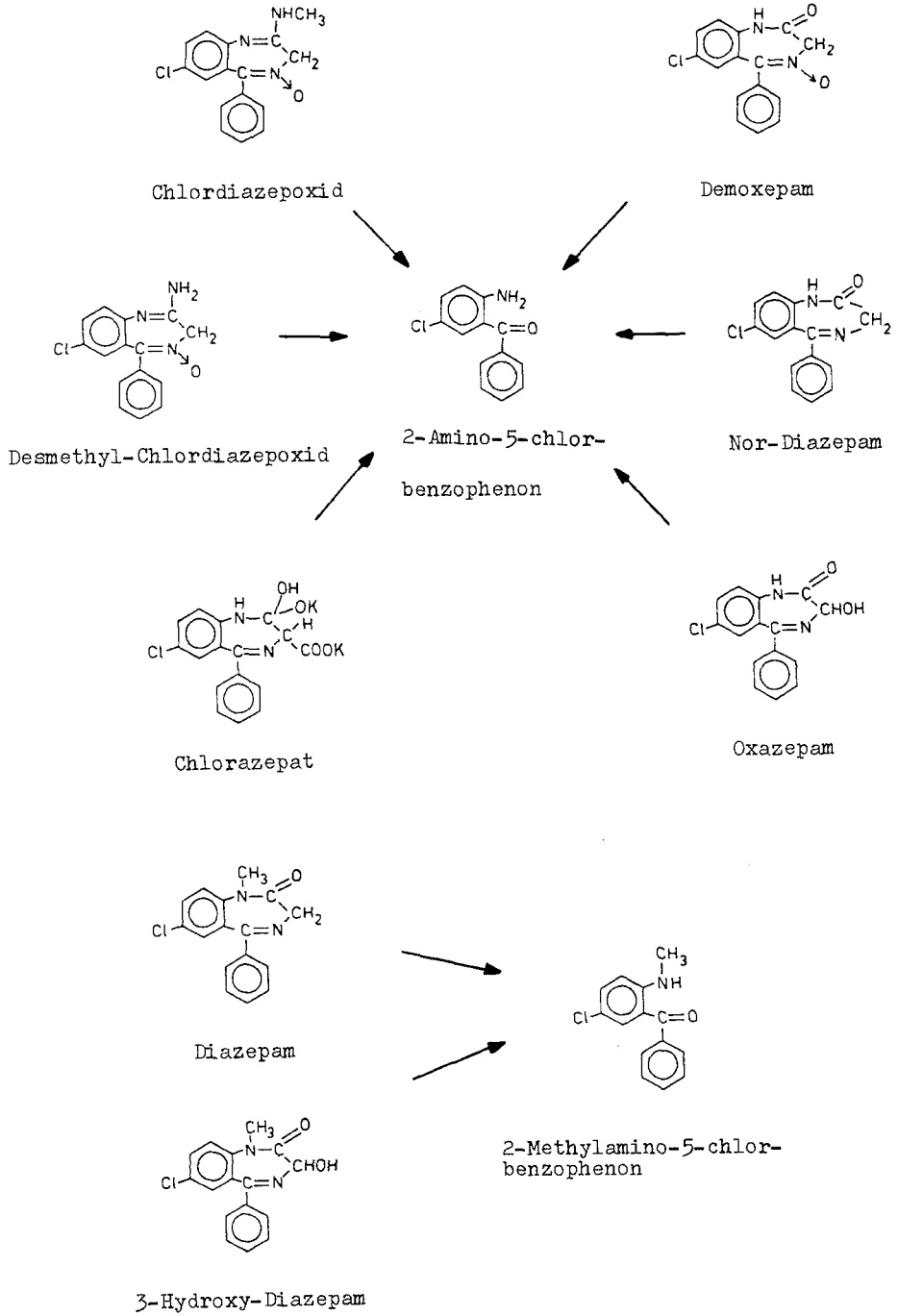
## Ergebnisse

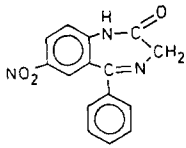
Die analytischen Daten sind in der Tabelle (Tab. 1) wiedergegeben. (Eine Übersicht der Entstehungsmöglichkeiten für die einzelnen Aminobenzophenone gibt Abb. 1.)

## Diskussion

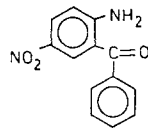
Aus den Daten ist ersichtlich, daß sich insbesondere bei Verwendung verschiedener stationärer Phasen (SE-30 bzw. OV-17; u. U. noch weitere) und Berücksichtigung der jeweils in Frage kommenden Metaboliten gute Differenzierungen und Zuordnungen erzielen lassen.

Eine weitere Charakterisierung mit Hilfe dünn-schichtchromatographischer Methoden ist in Zweifelsfällen anzuraten, (vgl. 26–28).

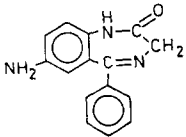




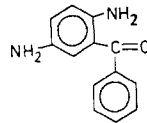
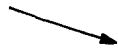
Nitrazepam



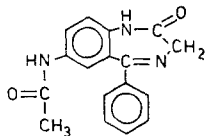
2-Amino-5-nitrobenzophenon



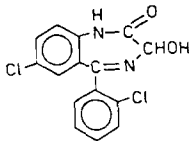
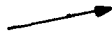
7-Amino-Nitrazepam



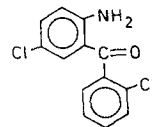
2,5-Diamino-benzophenon



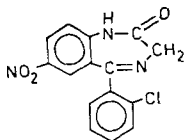
7-Acetamido-Nitrazepam



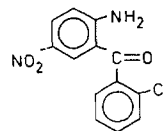
Lorazepam



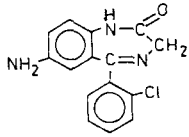
2-Amino-5,2'-dichlorobenzophenon



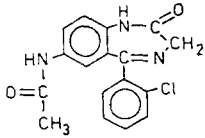
Clonazepam



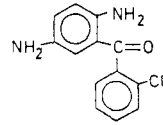
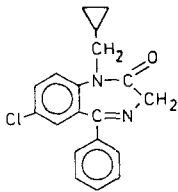
2-Amino-5-nitro-2'-chlorobenzophenon



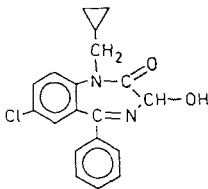
7-Amino-Clonazepam



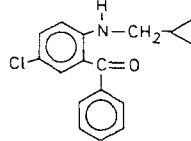
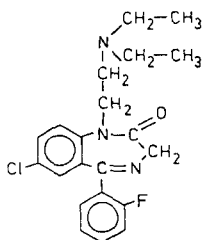
7-Acetamido-Clonazepam

2,5-Diamino-2'-chlor-  
benzophenon

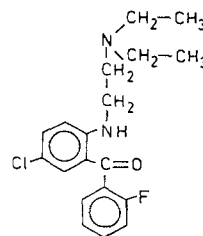
Prazepam



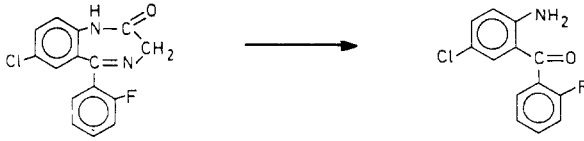
3-Hydroxy-Prazepam

2-Cyclopropyl-methylamino- 5-chlor-  
benzophenon

Flurazepam

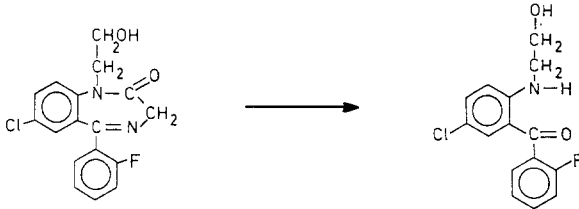
2-Diäthylamino-äthylamino-  
5-chlor-2'-fluor-benzophenon





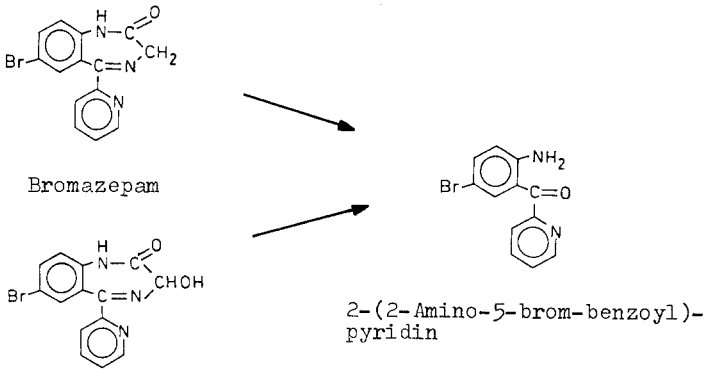
N-1-Desalkyl-Flurazepam

2-Amino-5-chlor-  
2'-fluor-benzophenon



N-1-Hydroxyäthyl-Flurazepam

2-Hydroxyäthylamino-5-chlor-  
2'-fluor-benzophenon



Bromazepam

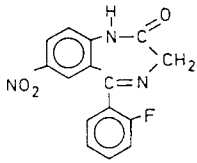
2-(2-Amino-5-brom-benzoyl)-  
pyridin

3-Hydroxy-Bromazepam

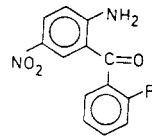


Flunitrazepam

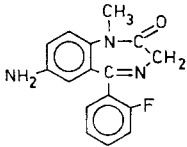
2-Methylamino-5-nitro-  
2'-fluor-benzophenon



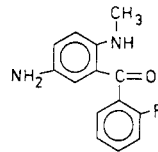
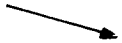
Nor-Flunitrazepam



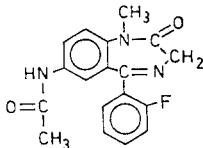
2-Amino-5-nitro-2'-fluor-benzophenon



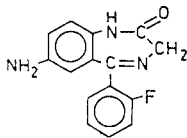
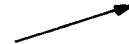
7-Amino-Flunitrazepam



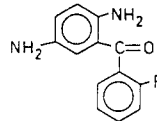
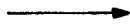
2-Methylamino-5-amino-2'-fluor-benzophenon



7-Acetamido-Flunitrazepam



7-Amino-Nor-Flunitrazepam



2,5-Diamino-2'-fluor-benzophenon

## Literatur

1. M. Geldmacher-von Mallinckrodt, U. Mang.: Schnelldiagnostik von Metaboliten des Methaqualon und der Chlordiazepoxidgruppe im Urin. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 8, 259–262 (1970)
2. J. Bäumler, S. Rippstein: Über den Nachweis von Librium und seinen Metaboliten. *Helv. Chim. Acta* 44, 2208–2210 (1961)
3. E. Stahl: *Dünnschichtchromatographie*. Berlin–Heidelberg–New York: Springer 1967
4. R. C. Baselt, C. B. Stewart, S. J. Franch: Toxicological Determination of Benzodiazepines in Biological Fluids and Tissues by Flame-Ionization Gas Chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 1, 10–13 (1977)
5. D. J. Berry, J. Grove: Emergency Toxicological Screening for Drugs Commonly Taken in Overdose. *J. Chromatogr.* 80, 205 (1973)

6. J. M. Clifford, W. F. Smyth: The Determination of Some 1,4-Benzodiazepines and Their Metabolites in Body Fluids. A Review. *The Analyst* **99**, 241–273 (1974)
7. R. H. Cravey, N. C. Jain: The Identification of Non-Barbiturate Hypnotics from Biological Specimens. *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 237–245 (1974)
8. J. A. F. De Silva: *Gas Chromatography in Drug Research*, pp. 252–265. New York: Grune and Stratton Inc. 1968
9. J. A. F. De Silva, I. Bekersky, C. V. Puglisi, M. A. Brooks, R. E. Weinfeld: Determination of 1,4-Benzodiazepines and -Diazepin-2-ones in Blood by ECD-GLC. *Anal. Chem.* **48**, 10–19 (1976)
10. J. L. Ferguson, D. Couri: Electron Capture Gas Chromatography Determination of Benzodiazepines and Metabolites. *J. Anal. Toxicol.* **1**, 171–174 (1977)
11. B. S. Finkle, D. M. Taylor, E. J. Bonelli: A GC/MS Reference Data System for the Identification of Drugs of Abuse. *J. Chromatogr. Sci.* **10**, 312–333 (1972)
12. E. H. Foerster, D. Hatchett, J. C. Garriott: A Rapid, Comprehensive Screening Procedure for Basic Drugs in Blood or Tissues by Gas Chromatography. *J. Anal. Toxicol.* **2**, 50–55 (1978)
13. D. M. Hailey: Chromatography of 1,4-Benzodiazepines. *Chromat. Rev.* **18**, 527 (1974), *J. Chromatogr.* **98**, 527 (1974)
14. A. Heyndrickx, A. de Leenheer: Identification of 1,4-Benzodiazepines in Biological Samples of Man. *Farmaceut. Tijdschrift voor België* **48**, 1–9 (1971)
15. S. J. Mulé: Routine Identification of Drugs of Abuse in Human Urine. I. Application of Fluorometry, TLC and GLC. *J. Chromatogr.* **55**, 255–266 (1971)
16. S. J. Mulé, M. L. Bastos, D. Jukofsky, E. Saffer: Routine Identification of Drugs of Abuse in Human Urine. II. Development and Application of the XAD-2 Resin Column Method. *J. Chromatogr.* **63**, 289–301 (1971)
17. W. O. Pierce, T. C. Lamoreaux, F. M. Urry, L. Kopjak, B. S. Finkle: A New, Rapid Gas Chromatography Method for the Detection of Basic Drugs in Postmortem Blood, Using a Nitrogen Phosphorus Detector. Part I: Qualitative Analysis. *J. Anal. Toxicol.* **2**, 26–31 (1978)
18. I. Sunshine: *Handbook of Analytical Toxicology*. Cleveland, Ohio: The Chemical Rubber Company 1969
19. I. A. Zingales: Systematic Identification of Tricyclic Psychotropic Drugs. *J. Chromatogr.* **31**, 405–419 (1967)
20. I. A. Zingales: Systematic Identification of Psychotropic Drugs by Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr.* **34**, 44–51 (1968)
21. H. Berninger, M. R. Möller: Retentionsindices zur gaschromatographischen Identifizierung von Arzneimitteln. *Arch. Toxicol.* **37**, 295 (1977)
22. M. R. Möller: *Habil. Schrift Homburg/Saar* (1977)
23. R. E. Kaiser: Retentionsdaten, Retentionsindices in der Gaschromatographie. *Chromatographia* **3**, 134 (1970)
24. R. E. Kaiser: Rechner in der Gaschromatographie. I. Präzise Retentionsindices aus Brutto-retentionszeiten. *Chromatographia* **7**, 251 (1974)
25. E. Kovats: Gas-chromatographische Charakterisierung organ. Verbindungen. Teil I: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta* **41**, 1915 (1958)
26. S. Ebel, H. Schütz: Zur Analytik von Flunitrazepam (Rohypnol), einem neuen Benzodiazepin-derivat, unter besonderer Berücksichtigung der Metaboliten. *Z. Rechtsmed.* **81**, 107–117 (1978)
27. S. Ebel, H. Schütz: Dünnschichtchromatographischer Nachweis wichtiger Pharmaka über primäre aromatische Aminogruppen als Schlüsselfragment. *Dtsch. Apoth.-Z.* **117**, 1605–1609 (1977)
28. H. Schütz: *Dissertation, Marburg* (1977)

Eingegangen am 28. Juni 1978