

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen zur Analytik von Clobazam (Frisium)*

W. Gielsdorf und M. Herper

Direktion Polizeitechnische Untersuchungen, Gothaer Str. 19, D-1000 Berlin 62

Investigations of Clobazam (Frisium) by Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Summary. Clobazam (Frisium) was hydrolyzed according to three methods commonly used in the determination of 1,4-benzo-diazepines; the reaction products were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry and thin-layer chromatography.

Five degradation products were obtained for which structure proposals are discussed. After oral intake two of these substances were also detected in human urine.

It should be recognized that some of the above mentioned substances may be on-column degradation products of artifacts occurring during hydrolyzation and/or sample clean-up.

Key words: Clobazam identification – Gas chromatography/mass spectrometry, clobazam

Zusammenfassung. Clobazam (Frisium) wurde nach drei zur Analyse von 1,4-Benzodiazepinen üblichen Hydrolysemethoden hydrolysiert; die Reaktionsprodukte wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch sowie dünn-schichtchromatographisch untersucht. Dabei konnten fünf Abbauprodukte nachgewiesen werden, für die Strukturvorschläge diskutiert werden. Zwei dieser Verbindungen konnten nach Medikamenteneinnahme auch im menschlichen Urin identifiziert werden.

Für einige der vorgestellten Substanzen müssen jedoch thermisch bedingte Zersetzungen und Umlagerungen auf der GC-Säule bzw. hydrolyse- und aufarbeitungsbedingte Artefaktbildungen bedacht werden.

Schlüsselwörter: Clobazam-Nachweis – GC/MS, Clobazam

* Wir danken der Fa. Hoechst AG, Frankfurt, für die Überlassung von Vergleichssubstanzen und die Förderung der Arbeit sowie Herrn Tenczer, Landesanstalt für gerichtl. Chemie und Arzneimittelchemie, Berlin, für wertvolle Diskussionsbeiträge

Der forensisch-toxikologische Nachweis des 1,5-Benzodiazepins Clobazam (Fri-sium) im biologischen Material ist — besonders im Hinblick auf verkehrsmedi-zinische Fragestellungen — von erheblichem Interesse. Daher sind zum Nachweis der Verbindung (und einiger Metaboliten) eine Reihe chromatographischer und spektroskopischer Verfahren in der Literatur beschrieben [1–6].

Die für den Nachweis der 1,4-Benzodiazepine übliche einfache und empfind-liche dünn-schichtchromatographische Methode [7–10] kann — da die Bildung eines Benzophenons bei der Hydrolyse nicht möglich ist — zur Untersuchung auf Clobazam nicht verwendet werden.

Ziel unserer Untersuchungen war es, die Verbindung in den für die 1,4-Benzodiazepine beschriebenen Analysengang (saure Hydrolyse; Extraktion bei pH 7 mit Ether) zwanglos einzufügen und eine Methode für den Nachweis im *Urin* zu entwickeln, da uns nur in Ausnahmefällen Blut bzw. Serum zur Verfügung steht.

Da Clobazam im Urin jedoch „schlecht ausgeschieden“ wird [3], bot sich als Methode der Wahl die Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer an.

Arbeitsmethodik

Zwei gesunde, männliche Versuchspersonen erhielten morgens und abends jeweils eine einmalige Dosis von 15 mg Clobazam. Die Probanden hatten mindestens zwei Wochen vor dem Versuch keinerlei Arzneimittel eingenommen. Nach Medikamenteneinnahme wurde der Harn bis einschließlich dem darauf-folgenden Tag gesammelt und bis zur Aufarbeitung gekühlt in Glasflaschen auf-bewahrt; vor Versuchsbeginn wurde eine Harnprobe als „Leerprobe“ gesammelt und wie die medikamentenhaltigen Proben behandelt.

Die *Extraktion des Harns* erfolgte bei pH 1–2 und 13–14 mit Chloroform sowie nach salzsaurer Hydrolyse bei neutralem pH mit Ether und anschließend bei pH 8,7 mit Chloroform.

*Hydrolyse von Clobazam*¹

Da die Literaturangaben über Säurekonzentration und Dauer der Hydrolyse erheblich differieren, hydrolysierten wir Clobazam nach folg. Methoden:

Methode 1: In Anlehnung an die bei [3] beschriebenen Versuche wurden 100 mg Clobazam mit 10 ml Methanol, 30 ml Wasser und 10 ml konz. Salzsäure versetzt und 30 min unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Einstellen auf pH 10,7 wurde mit Chloroform extrahiert, die org. Phase über Natriumsulfat getrocknet und dann filtriert; das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer abgezogen.

Salzsäure-Konzentration ca. 7%.

Methode 2: 500 mg Clobazam wurden mit 50 ml Methanol, 100 ml Wasser und 100 ml konz. Salzsäure in einem Erlenmeyerkolben auf einem Asbestnetz über der Bunsenflamme 6 min gekocht. Dann wurde bei neutralem pH mit Ether und daran

¹ Da Clobazam in Wasser schlecht löslich ist, wurde Methanol als Lösungsmittel verwendet

anschließend bei pH 8,7 mit Chloroform extrahiert und die Extrakte wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Salzsäure-Konzentration ca. 14%.

Methode 3: 50 mg Clobazam, 5 ml Methanol, 10 ml Wasser und 10 ml 25%ige Salzsäure wurden 30 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Weitere Aufarbeitung siehe Methode 2.

Salzsäure-Konzentration ca. 10%.

Die Extraktionsrückstände wurden in wenig Chloroform/Methanol aufgenommen und direkt chromatographiert bzw. in den GC injiziert.

Zur *Dünnschichtchromatographie* (DC) wurden Fertigplatten HF₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt) verwendet. Von den zahlreichen getesteten Fließmitteln bewährte sich das von Hajdú et al. [4] empfohlene Gemisch aus Chloroform/n-Heptan/Methanol 85 + 10 + 5 sowie die Unterphase des Gemisches Chloroform/Methanol/Toluol/Ammoniak 40 + 20 + 30 + 10. Als Detektionsmittel dienen [11]:

1. Dragendorff-Reagenz (mod. nach Thies u. Reuther und Nachbesprühen mit einer 5%igen wäßrigen Eisen-(III)-chlorid-Lösung)
2. Liebermann-Reagenz
3. Kaliumjodoplatinat

Bedingungen für die GC-MS-Kombination

GC-MS	Finnigan Mod. 4023
Trägergas	He 20 ml/min
Reaktandgase für CI	Methan; iso-Butan; Ammoniak
Quellendruck	$1,5 \times 10^{-7}$ Torr (EI); $1,5 \times 10^{-5}$ (CI)

Temperaturen:

Einspritzblock, Ionenquelle	250°C
Separator (Jet)	260°C
Ofen	Temperturprogramm 100°C 1 min, 15°C/min bis 280°C, 10 min isotherm
Elektronenenergie	70 eV
Trennsäule	4 ft.; Pyrex; 2 mm i. D.
Phase	3% OV-17 auf Gas Chrom Q (100/120 mesh)

Zur *hochauflösenden Massenspektrometrie* wurden die Proben über den Direkt-einlaß in das MS-50 (Kratos/AEI) eingeführt (Ionenquellentemperatur: 180°C).

Ergebnisse und Diskussion

Hydrolyseverhalten von Clobazam

Die Hydrolyse von Clobazam (I; Mol. Gew. 300 = C₁₆H₁₃N₂O₂Cl) nach Methode 1 führt erwartungsgemäß zum 5-Chlor-2-(N-methylacetamido)-diphenyl-

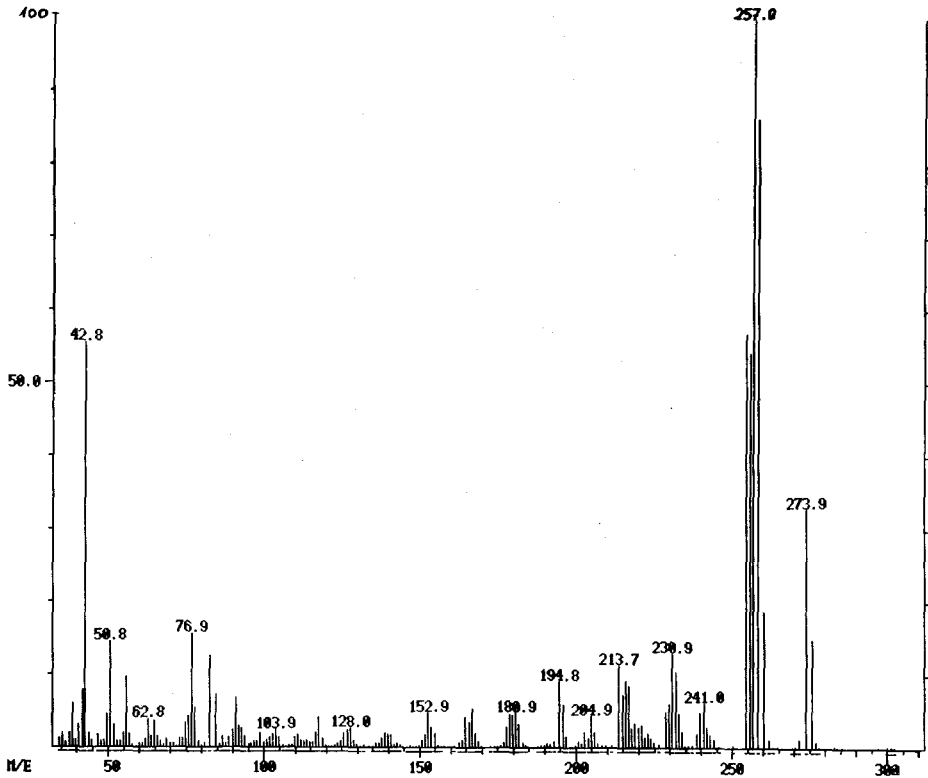


Abb. 1. Massenspektrum von II (MG = 274)

amin (II; Abb. 1) [3]. Die massenspektrometrische Untersuchung des Reaktionsgemisches mittels Direkteinlaß (DE) zeigt neben Spuren der unveränderten Ausgangsverbindung, diese Verbindung mit einem Molekülion bei m/e 274 ($C_{15}H_{15}N_2OCl$); geschieht der Probeneinlaß jedoch über den Gaschromatographen, erscheint zusätzlich eine Verbindung mit dem Mol. Gew. 256/258, deren Summenformel durch hochauflösende MS zu $C_{15}H_{13}N_2Cl$ bestimmt wurde (III; Abb. 2). Dies entspricht dem Verlust eines Moleküls Wasser aus II und deutet damit auf eine thermisch bedingte Zersetzung auf der GC-Säule hin, wie sie für viele 1,4-Benzodiazepine beschrieben ist [12, 13]; Verbindung III käme somit die Struktur eines Chinoxalin-Derivats zu.

Die Hydrolysemethoden 1 und 2 lieferten identische Reaktionsprodukte.

Im Gaschromatogramm (Abb. 3) der bei neutralem pH mit Ether extrahierten Reaktionsprodukte zeigten sich neben der unveränderten Ausgangssubstanz und Verbindung III noch Signale für zwei weitere Substanzen mit Molpeaks bei m/e 258/260 ($C_{14}H_{11}N_2OCl$) und m/e 314/316 ($C_{17}N_{15}N_2O_2Cl$) (Abb. 4 u. 5).

Bei Verbindung IV könnte es sich um ein Benzimidazolone-Derivat handeln, dessen Entstehung durch Spaltung der C-N-Bindung mit anschließender Ringkonzentration zu erklären wäre [6].

Die Entstehung von V — einem „Methyl-Clobazam“ — läßt sich mit der leichten Alkylierbarkeit der aktivierten Methylengruppe in Position 3 des 7er

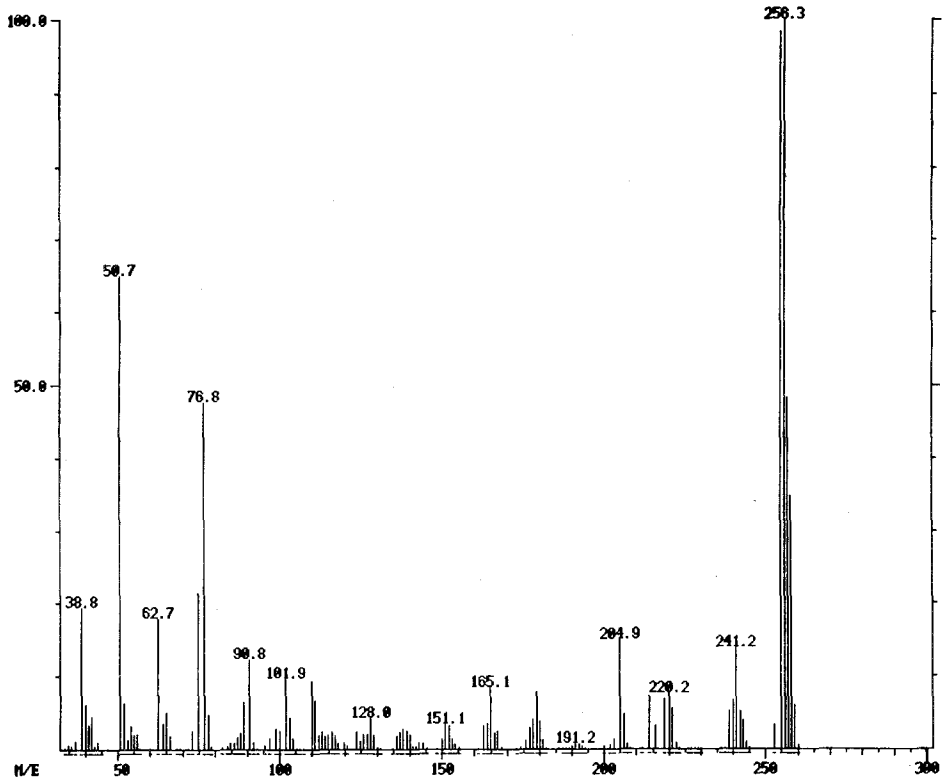


Abb. 2. Massenspektren von III (MG = 256/258)

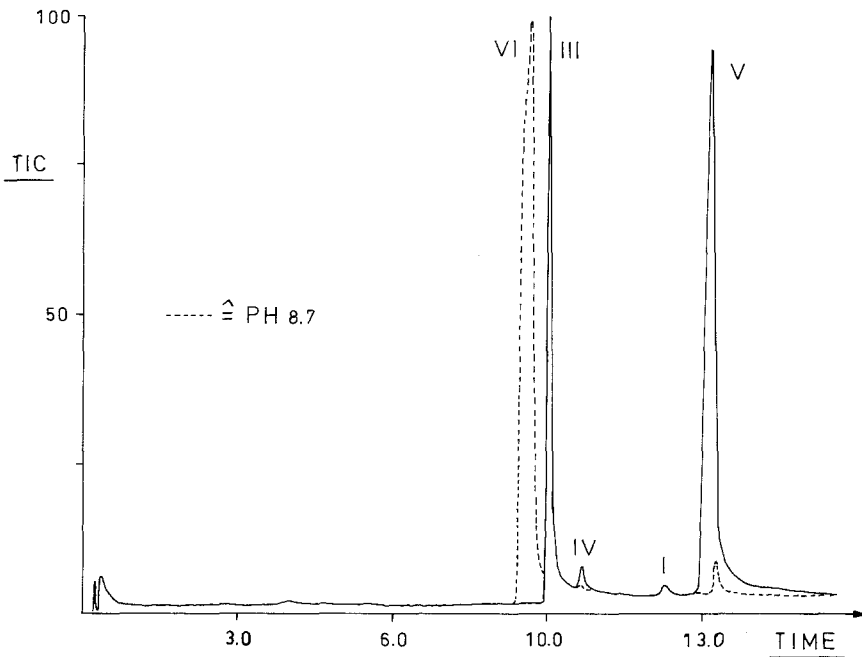


Abb. 3. Gaschromatogramm der bei neutralen und basischen pH extrahierten Reaktionsgemische

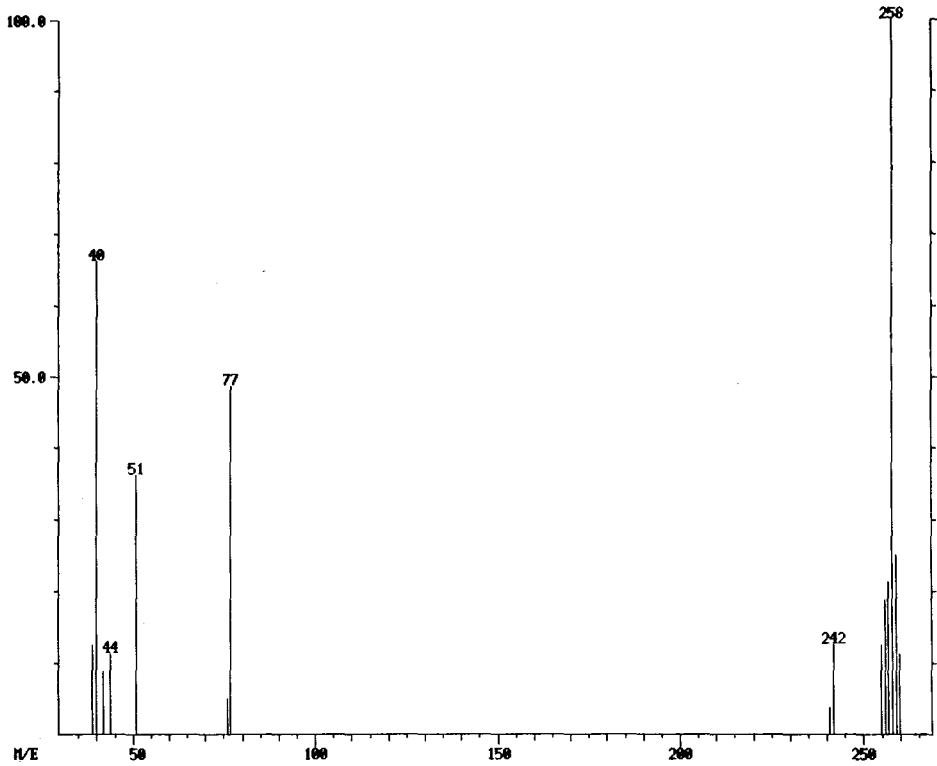


Abb. 4. Massenspektrum von IV (MG = 258/260)

Ringes begründen [6]. Wird die Hydrolyse *ohne* Methanol-Zusatz durchgeführt, verschwindet auch Verbindung V!

Der mit Ether extrahierte Rückstand wurde anschließend bei pH 8,7 mit Chloroform nachextrahiert (--- in Abb. 3).

Die Massenspektren der vier im Gaschromatogramm sichtbaren peaks zeigen neben den nicht vollständig extrahierten Verbindungen III–V noch eine zusätzliche Verbindung (VI) mit dem Mol. Gew. 242 ($C_{14}H_{11}N_2Cl$; Abb. 6).

Die Messung der Probe über den Direkteinlaß ergab jedoch ein Molekülion bei m/e 256/258 mit 100% rel. Int., das Ion m/e 242 lieferte 15% der rel. Int., die Temperatur der Schubstange betrug $100^\circ C$. Bei Erhöhung dieser Temperatur auf $280^\circ C$ kehrten sich die Intensitätsverhältnisse um: der base-peak im Spektrum war nunmehr m/e 242, auf das Ion m/e 256 entfielen ca. 45% der rel. Int.

Ausscheidungsversuche

Im alkalisch extrahierten Urinextrakt *vor* Hydrolyse konnten geringe Mengen der Verbindungen IV und VI nachgewiesen werden, letztere auch nach Hydrolyse und Extraktion bei pH 8,7 mit Chloroform.

In allen Extrakten waren weder die unveränderte Ausgangsverbindung bzw. deren Hauptmetaboliten N-Demethylclobazam, 4'-Hydroxyclobazam und 4'-Hydroxi-N-demethylclobazam, noch andere körperfremde Substanzen nachweisbar.

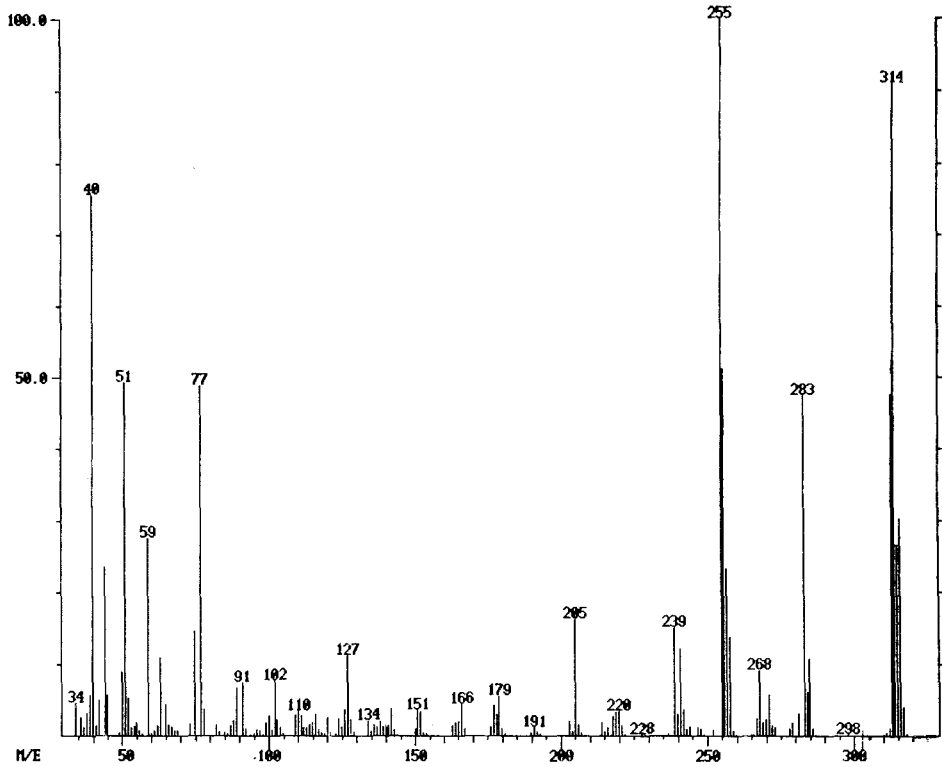


Abb. 5. Massenspektrum von V (MG = 314)

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der einzelnen Hydrolyseansätze ergab jeweils fünf, drei bzw. vier Reaktionsprodukte, die alle im kurzwelligigen UV-Licht eine Lösung zeigen. Von diesen Substanzen waren mit Reagenz 1 jeweils 4, 2 und 3, mit Reagenz 2 und 3 jeweils nur eine Verbindung anfärbbar; im alkalischen Urinextrakt des Ausscheidungsversuchs reagierten mit den Detektionsmitteln 1 und 2 jeweils zwei Verbindungen.

Die Nachweisreaktionen von Clobazam und seinen Hydrolyseprodukten sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt, wobei bei positivem Ausfall der jeweiligen Reaktion eine rot-orange, violette oder blaugraue Farbe zu beobachten war:

Verbindung	Sprühreagenz		
	1	2	3
I	+	-	-
II	-	+	+
III	(+)	+	+
IV	(+)	+	+
VI (bleibt am Start)	+	-	+

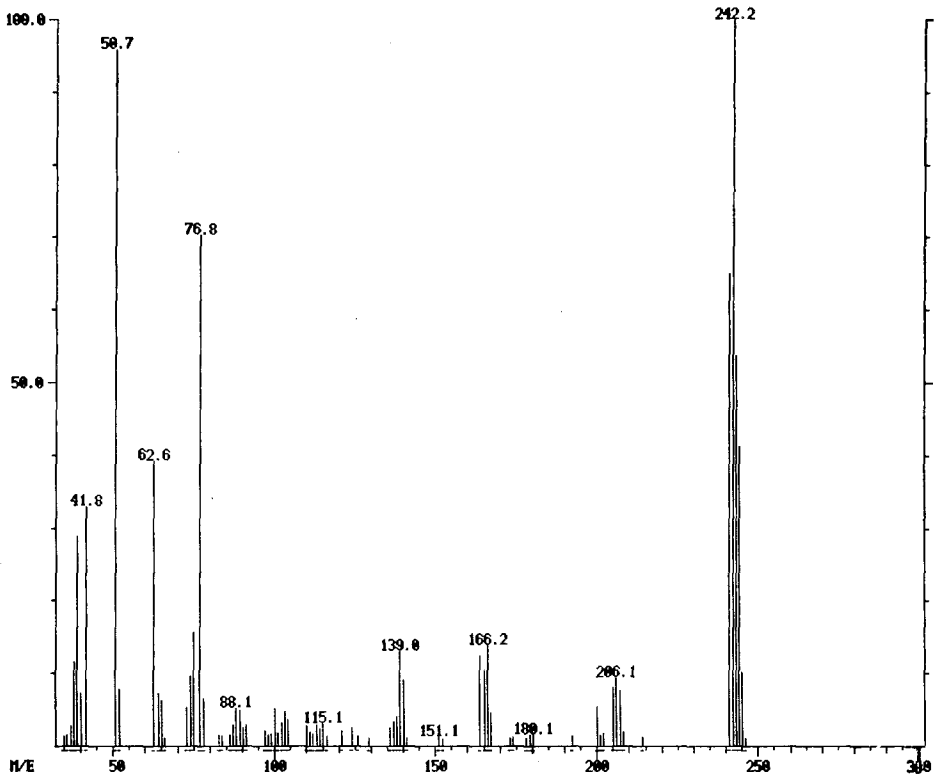


Abb. 6. Massenspektrum von VI (MG=242)

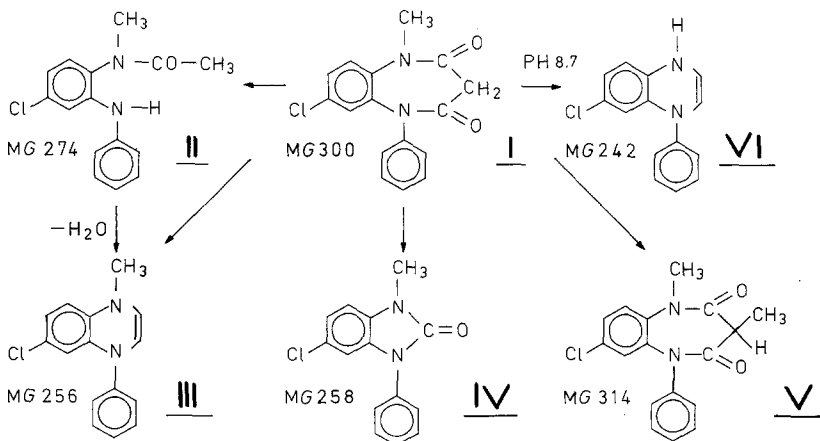


Abb. 7. Die Hydrolyseprodukte des Clobazam, Frisium

Nach der DC-Trennung sollte mit dem Aufsprühen des Detektionsmittels nicht zu lange gewartet werden, da die Substanzen sich auf der DC-Platte unter intensiver Gelbfärbung zersetzen.

Die vorgestellten Ergebnisse unserer Untersuchungen erscheinen im Augenblick z. T. widersprüchlich und verwirrend; sie sind jedoch reproduzierbar und können — besonders im Hinblick auf die bei den Ausscheidungsversuchen gewonnenen Erkenntnisse — die Grundlage für ein spezifisches Clobazam-Nachweisverfahren *ohne* zeitraubende Hydrolyse bilden.

Nachtrag

Im Rahmen der Entwicklung einer Methode zum qualitativ/quantitativen Nachweis des Clobazam in *Arzneimittel-Zubereitungen* haben kürzlich F. Eiden und E. Schmitz die physikalisch-chemischen Parameter und das Reaktionsverhalten der Verbindung eingehend untersucht [14].

Literatur

- 1 Stewart JT, Honigberg IL, Tsai AY, Hajdú P (1979) Fluorometric determination of clobazam, a 1.5-benzodiazepine, in human plasma. *J Pharmacol Sci* 68 (4):494
- 2 Schütz H (1978) Analytische Daten des neuen 1,5-Benzodiazepins Clobazam (Frisium) und seines Hauptmetaboliten Nor-Clobazam. *Arch Toxicol* 41:233
- 3 Sticht G, Käferstein H (1978) Nachweis von Clobazam (Frisium) in biologischem Material. *Z Rechtsmed* 82:105
- 4 Hajdú P, Uihlein M, Damm D (1980) Quantitative determination of clobazam in serum and urine by GLC, TLC, and fluorometry. *Mitt Hoechst AG, Frankfurt*
- 5 Caccia S, Ballabio M, Guiso G, Zanini MG (1979) Gas-liquid chromatographic determination of clobazam and N-desmethylclobazam in plasma. *J Chromatogr* 164:100
- 6 Hanks GW, Lader MH, Lawson DH (eds) (1979) Proceedings of a symposium on clobazam—April 1978. *Br J Clin Pharmacol (Suppl 1)* 7
- 7 Battista HJ, Udermann H, Henning G, Vycudilik W (1979) Zum Nachweis der Benzodiazepine in der forensischen Chemie. *Beitr Ger Med* 37:5
- 8 Clifford JM (1974) The determination of some 1.4-benzodiazepines and their metabolites in body fluids. A review. *Analyst* 99:241
- 9 Schütz H, Westenberger V (1978) Gaschromatographische Daten von 19 Hydrolysederivaten aus 12 wichtigen Benzodiazepinen und 17 Hauptmetaboliten. *Z Rechtsmed* 82:43
- 10 Geldmacher-Mallinckrodt M v (1976) Einfache Untersuchungen auf Gifte im klinisch-chemischen Laboratorium. Thieme, Stuttgart
- 11 Merck E (1972) Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie. Darmstadt
- 12 Clatworthy AJ, Jones LV, Whitehouse MJ (1977) The gas chromatography mass spectrometry of the major metabolites of flurazepam. *Biomed Mass Spectr* 4 (4):248
- 13 Hailey DH (1974) Chromatography of the 1.4-benzodiazepines. *J Chromatogr* 98:527
- 14 Eiden F, Schmitz E (1980) Clobazam (Frisium) — Ein Beitrag zur Analyse von Psychopharmaka. *Dtsch Apotheker Z* 120 (21):933

Eingegangen am 7. März 1980