

CHROM. 9541

ANALYSE VON BENZODIAZEPINEN UND DEREN HYDROLYSEPRODUKTE, DEN BENZOPHENONEN, DURCH HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE IN UMGEKEHRTER PHASE UND IHRE ANWENDUNG AUF BIOLOGISCHES MATERIAL

KLAUS HARZER und REINHOLD BARCHET

Chemisches Untersuchungsamt der Stadt Stuttgart, Staffenbergstrasse 81, 7000 Stuttgart 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 15. März 1976; geänderte Fassung eingegangen am 23. Juni 1976)

SUMMARY

Analysis of benzodiazepines and their hydrolysis products, benzophenones, by reversed-phase high-performance liquid chromatography and its application to biological material

Conditions for the routine separation of some benzodiazepines and their hydrolysis products, benzophenones, by reversed-phase high-performance liquid chromatography have been developed. They were applied to the qualitative and quantitative determination of benzodiazepines and benzophenones in biological material, e.g., blood and urine.

EINFÜHRUNG

1960 wurde Chlordiazepoxid (Librium®) als erstes Benzodiazepin in den Arzneischatz eingeführt. Seither wurden eine ganze Reihe von Strukturanaloga entwickelt, wobei das Diazepam (Valium®) und das Oxazepam (Adumbran®) die bekanntesten sein dürften.

Die therapeutische Dosierung der Benzodiazepine, die als Sedativa verwendet werden, ist mit 5–30 mg im Vergleich zu anderen Sedativa, wie Phenobarbital (200 mg) und Mecprobamat (200 mg), gering und die Gefahr einer akuten Vergiftung bei Überdosierung ist minimal¹. Dennoch werden diese Mittel missbräuchlich verwendet. Einmal kann mit den Benzodiazepinen ein Abusus betrieben werden², zum anderen kommen bei Einnahme entsprechend grosser Dosen durchaus Vergiftungen vor. Bei unseren toxikologischen Untersuchungen sind wir deshalb beinahe täglich mit dem Problem des Nachweises der Benzodiazepine konfrontiert.

Für die Untersuchung von Blut kann die Gaschromatographie verwendet werden, wobei sowohl die unveränderten Benzodiazepine als auch deren Metaboliten erfasst werden³. Der Nachweis der Benzodiazepine im Urin wird am besten über deren Hydrolyseprodukte, die Benzophenone, geführt, wie es Bäumler und Rippstein am Beispiel des Chlordiazepoxids beschrieben haben⁴. Die Benzophenone können dann entweder dünnschichtchromatographisch⁴ oder gaschromatographisch⁵ identifiziert

werden. Eine Übersicht über Nachweismöglichkeiten verschiedener Benzodiazepine sowie weitere Literaturangaben finden sich bei Hailey⁶. Auch mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, die von Hailey nur am Rande erwähnt wird, wurden bereits Untersuchungen von Benzodiazepinen durchgeführt, wobei entweder eine Verteilungschromatographie⁷ oder eine Adsorptionschromatographie⁸⁻¹⁰ angewandt wurden.

Wir haben ebenfalls ein Verfahren zum Nachweis der Benzodiazepine und zusätzlich ihrer Hydrolysenprodukte, der Benzophenone, mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie in umgekehrter Phase ausgearbeitet, da bei forensischen Untersuchungen jeder Befund durch zwei voneinander unabhängigen Methoden abgesichert werden sollte. Es können so z.B. quantitative Befunde, die mit der Gaschromatographie erhalten wurden, bestätigt werden. Für einen Nachweis, der über die Benzophenone geführt wurde und unterhalb der Erfassungsgrenze der Dünnschichtchromatographie liegt, stehen somit auch zwei Methoden zur Verfügung.

EXPERIMENTELLE DATEN

Geräte

Für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie verwendeten wir ein Gerät Perkin-Elmer Modell 1250 mit UV-Detektor bei 254 nm. Die Stahlsäule, 25 cm × 4 mm, enthielt ein C₁₈-Reversed-Phase-Material auf Merck (Darmstadt, B.R.D.) LiChrosorb Si-100 (Korngröße 10 μm) und wurde bei Zimmertemperatur betrieben. Der Druck betrug 750 p.s.i., die Durchflussgeschwindigkeit 0.75 ml/min und der Papiervorschub 5 mm/min.

Die mobile Phase bestand aus Mischungen von Methanol-Wasser, die zwischen 60–100% Methanol variiert wurden.

Für die gaschromatographischen Untersuchungen verwendeten wir ein Gerät Perkin-Elmer Modell F 22 mit N-FID-Detektor. Glassäule, 2 m × 0.125 Zoll; stationäre Phase, 2.5% OV-1; Trägergas, Stickstoff; Durchfluss, 25 ml/min; Verbrennungsgas, Luft und Wasserstoff; Temperatur der Säule, 250°; Temperatur des Einspritzblockes, 280°.

Aufarbeitung der Proben

Blut. 5–10 ml homogenisiertes Blut wurden mit Borat-KCl Puffer (37.1 g H₃BO₃ und 44.7 g KCl auf 1 Liter aufgefüllt) auf pH 9.5 eingestellt und auf 20 ml aufgefüllt, anschliessend auf Extraktions Säulen Extrelut[®] der Firma Merck aufgezo-gen und mit 40 ml Diäthyläther extrahiert¹¹. Nach Abdampfen des Äthers wurde der Rückstand in Methanol für quantitative Bestimmungen definiert in 200 μl aufgenommen und eingespritzt.

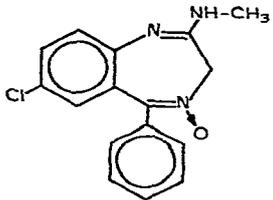
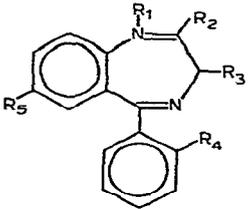
Für die Zusatzversuche wurden je 10 ml homogenisiertes Rinderblut verwendet.

Urin. Die Aufarbeitung des Urins erfolgte nach der bekannten Methode von Bäumler und Rippstein⁴, nämlich Säurehydrolyse des Urins und anschliessende alkalische Ätherextraktion. Die Ätherphase wurde dann eingedampft, der Rückstand in Methanol aufgenommen und eingespritzt.

ERGEBNISSE

Es wurden die Benzodiazepine mit den in Tabelle I aufgeführten Strukturfor-

TABELLE I
STRUKTURFORMELN VON BENZODIAZEPINEN

Nahme	Struktur																																																						
Chlordiazepoxid																																																							
																																																							
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R_1</th> <th>R_2</th> <th>R_3</th> <th>R_4</th> <th>R_5</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Diazepam</td> <td>CH₃</td> <td>=O</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Medazepam</td> <td>CH₃</td> <td>H₂</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Prazepam</td> <td>CH₂ </td> <td>=O</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Oxazepam</td> <td>H</td> <td>=O</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Chlorazepat (Dikaliumsalz)</td> <td>H</td> <td>(OH)₂</td> <td>COOH</td> <td>H</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Nitrazepam</td> <td>H</td> <td>=O</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>NO₂</td> </tr> <tr> <td>Lorazepam</td> <td>H</td> <td>=O</td> <td>OH</td> <td>Cl</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Flurazepam</td> <td>C₂H₄N(C₂H₅)₂</td> <td>=O</td> <td>H</td> <td>F</td> <td>Cl</td> </tr> </tbody> </table>		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Diazepam	CH ₃	=O	H	H	Cl	Medazepam	CH ₃	H ₂	H	H	Cl	Prazepam	CH ₂ 	=O	H	H	Cl	Oxazepam	H	=O	OH	H	Cl	Chlorazepat (Dikaliumsalz)	H	(OH) ₂	COOH	H	Cl	Nitrazepam	H	=O	H	H	NO ₂	Lorazepam	H	=O	OH	Cl	Cl	Flurazepam	C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	=O	H	F	Cl
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5																																																		
Diazepam	CH ₃	=O	H	H	Cl																																																		
Medazepam	CH ₃	H ₂	H	H	Cl																																																		
Prazepam	CH ₂ 	=O	H	H	Cl																																																		
Oxazepam	H	=O	OH	H	Cl																																																		
Chlorazepat (Dikaliumsalz)	H	(OH) ₂	COOH	H	Cl																																																		
Nitrazepam	H	=O	H	H	NO ₂																																																		
Lorazepam	H	=O	OH	Cl	Cl																																																		
Flurazepam	C ₂ H ₄ N(C ₂ H ₅) ₂	=O	H	F	Cl																																																		

meln untersucht. Die meisten der aufgeführten Benzodiazepine lassen sich mit der Mischung Methanol-Wasser (70:30) trennen (Fig. 1).

Dagegen muss für die Trennung von Chlordiazepoxid und Dikaliumchlorazepat die Mischung Methanol-Wasser (60:40) gewählt werden, während Medazepam und Flurazepam nur mit 100% Methanol entwickelt werden können. Dies könnte mit der unterschiedlichen Polarität der Substanzen zusammenhängen, was jedoch nicht weiter untersucht wurde.

Tabelle II zeigt die Retentionszeiten der Benzodiazepine bei den angegebenen Elutionsmitteln. Die weitere Bestimmung der statistischen Daten wurde an den Beispielen Nitrazepam, Oxazepam und Chlordiazepoxid durchgeführt.

Standardabweichung

Bei zehn Einspritzungen betrug die Standardabweichung 1.7%.

Erfassungsgrenze

Wenn 1 μ l eingespritzt wurde, ergab sich die Erfassungsgrenze von 5 μ g/ml (Peak:Rauschverhältnis = 3:1).

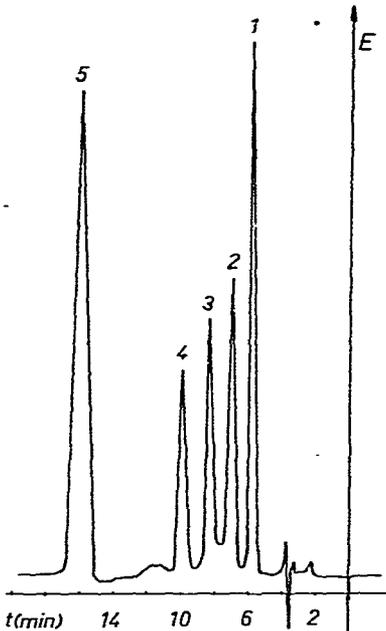


Fig. 1. Auftrennung von Benzodiazepinen mit Methanol-Wasser (70:30) 1 = Nitrazepam; 2 = Oxazepam; 3 = Chlordiazepoxid; 4 = Diazepam; 5 = Prazepam.

TABELLE II

RETENTIONSZEITEN VON BENZODIAZEPINEN BEI VERSCHIEDEN ZUSAMMENGESETZTEN MISCHUNGEN DES LAUFMITTELS METHANOL-WASSER

Substanz	Laufmittel Methanol-Wasser	Retentionszeit (min)
Chlordiazepoxid	60:40	16.8
Dikaliumchlorazepat		17.8
Nitrazepam	70:30	5.8
Lorazepam		6.8
Oxazepam		7.0
Chlordiazepoxid		8.4
Dikaliumchlorazepat		8.7
Diazepam		10.0
Prazepam		16.1
Medazepam	100:0	5.2
Flurazepam		9.4

Wiederfindungsrate

Tabelle III zeigt die Wiederfindungsraten. Es wurden jeweils Lösungen von 1 mg/ml hergestellt, von denen dann 1 ml zu 10 ml Rinderblut gegeben wurde.

Linearität

Die Linearität zwischen Lösungen verschiedener Konzentrationen und der Peakhöhe wird für die drei Beispiele in Fig. 2 dargestellt.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, kann der Nachweis der Benzodiazepine

TABELLE III

WIEDERFINDUNGSRATEN FÜR NITRAZEPAM, OXAZEPAM UND CHLORDIAZEPOXID

	Anzahl der Versuche	Wiederfindungsrate (%)
Nitrazepam	7	79
Oxazepam	7	86
Chlordiazepoxid	7	81

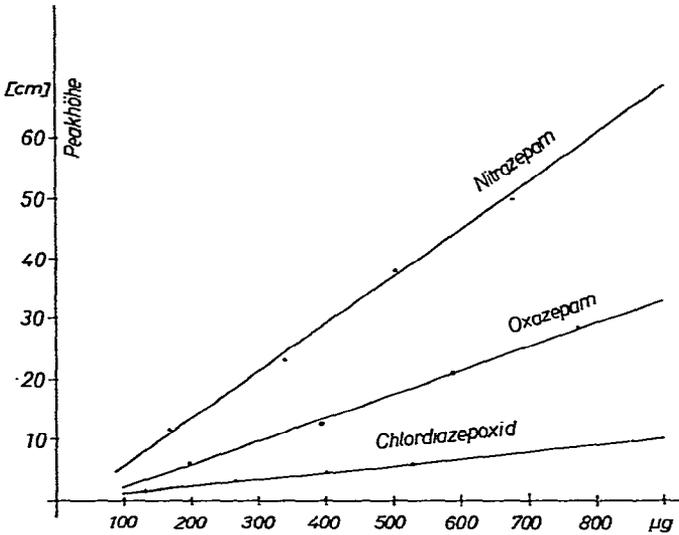


Fig. 2. Korrelation zwischen Peakhöhe und eingespritzter Menge für Nitrazepam, Oxazepam und Chlordiazepoxid. Laufmittel, Methanol-Wasser (70:30).

nach einer Säurehydrolyse über die davon abgeleiteten Hydrolysenprodukte, die Benzophenone, geführt werden. Für diese Nachweismethode bietet sich besonders der Urin an, da die Benzophenone teilweise in Form der Glucuronide ausgeschieden werden¹², so dass mit der Säurehydrolyse gleichzeitig die Glucuronide gespalten und die Benzodiazepine zu den Benzophenonen umgewandelt werden.

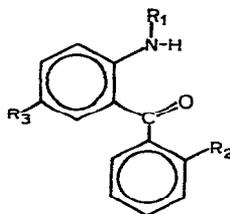
Der Nachweis der Benzodiazepine im Urin beschränkt sich meistens auf eine qualitative Analyse, da bei toxikologischen Untersuchungen normalerweise wegen der Dringlichkeit kein 24-Stunden-Urin zur Verfügung steht.

Die in Tabelle IV aufgeführten Benzophenone wurden in die Untersuchungen einbezogen (in Klammern die Benzodiazepine, aus denen die angeführten Benzophenone bei der Hydrolyse entstehen). Hier gelang es mit einem Laufmittel Methanol-Wasser (80:20) sämtliche aufgeführten Benzophenone zu trennen (Fig. 3).

Für die Untersuchung der weiteren Daten wurde als Beispiel das 5-Chlor-2-aminobenzophenon gewählt. Die Standardabweichung lag bei 1.8% (zehn Einspritzungen). Die Erfassungsgrenze betrug wie bei den Benzodiazepinen 5 µg/ml (bei Einspritzung von 1 µl). Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde 1 mg Chlordiazepoxid zu 30 ml Urin gegeben und entsprechend der angegebenen Vorschrift aufgearbeitet. Dabei ergab sich bei fünf Versuchen eine Wiederfindungsrate von 66%.

TABELLE IV
IN DIE UNTERSUCHUNG EINBEZOGENE BENZOPHENONE

Name



	R_1	R_2	R_3
5-Chlor-2-aminobenzophenon (Chlordiazepoxid, Oxazepam, Chlorazepat)	H	H	Cl
5-Chlor-2-methylaminobenzophenon (Diazepam)	CH ₃	H	Cl
5-Chlor-2-cyclopropylmethylaminobenzophenon (Prazepam)	CH ₂ - 	H	Cl
2',5-Dichlor-2-aminobenzophenon (Lorazepam)	H	Cl	Cl
5-Nitro-2-aminobenzophenon (Nitrazepam)	H	H	NO ₂

DISKUSSION

Das beschriebene Verfahren stellt eine gute Methode für den Nachweis von Benzodiazepinen und davon abgeleiteten Benzophenonen dar. Es kann anstelle der Gaschromatographie eingesetzt werden oder zur Absicherung von gaschromatographischen oder dünnschichtchromatographischen Befunden.

Tabelle V vergleicht an vier Beispielen die Werte, die mit der Gaschromatographie und der Hochdruckflüssigkeitschromatographie bei quantitativen Bestimmungen im Blut erhalten wurden. Die angegebene Erfassungsgrenze von 5 µg/ml erscheint gering. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nur 1 µl eingespritzt wurde. Es ist jedoch ohne weiteres möglich, mit entsprechenden Einlasssystemen 10, 50 oder mehr µl einzuspritzen, so dass die Erfassungsgrenze um diesen Faktor gesenkt werden kann¹³. Ausserdem kann bei Verwendung eines variablen UV-Detektors, bei dem die gewünschte Wellenlänge gewählt werden kann, durch Einstellung auf das Absorptionsmaximum der betreffenden Substanz die Empfindlichkeit noch weiter gesteigert werden.

Die Anwendung der Methode auf die Praxis soll an Hand der folgenden Beispiele gezeigt werden. Ein Junge soll neun Tabletten Adumbran® (Inhaltsstoff Oxazepam) eingenommen haben (Fig. 4), und ein Junge bekam therapeutisch Valium® (Inhaltsstoff Diazepam) bei einer Vergiftung mit Norgesic® (Inhaltsstoffe Orphenadrincitrat und Aminophenazon) (Fig. 5). Neben Diazepam können gleichzeitig dessen Stoffwechselprodukt Oxazepam sowie Aminophenazon und dessen Metaboliten 4-Aminoantipyrin und 4-Acetylaminoantipyrin identifiziert werden. Fig. 6 zeigt das typische Bild nach einer Diazepamvergiftung, wenn der Urin auf Benzophenone aufgearbeitet wird. Es können auf Grund des Diazepammetabolismus sowohl 5-Chlor-2-

TABELLE V

VERGLEICH VON GASCHROMATOGRAPHIE UND HOCHDRÜCKFLÜSSIGKEITS-
CHROMATOGRAPHIE (HPLC) BEI QUANTITATIVEN BESTIMMUNGEN

	GC ($\mu\text{g/ml}$)	HPLC ($\mu\text{g/ml}$)
Oxazepam	1.85	1.6
	1.35	1.6
	0.47	0.55
Chlordiazepoxid	1.4	1.58

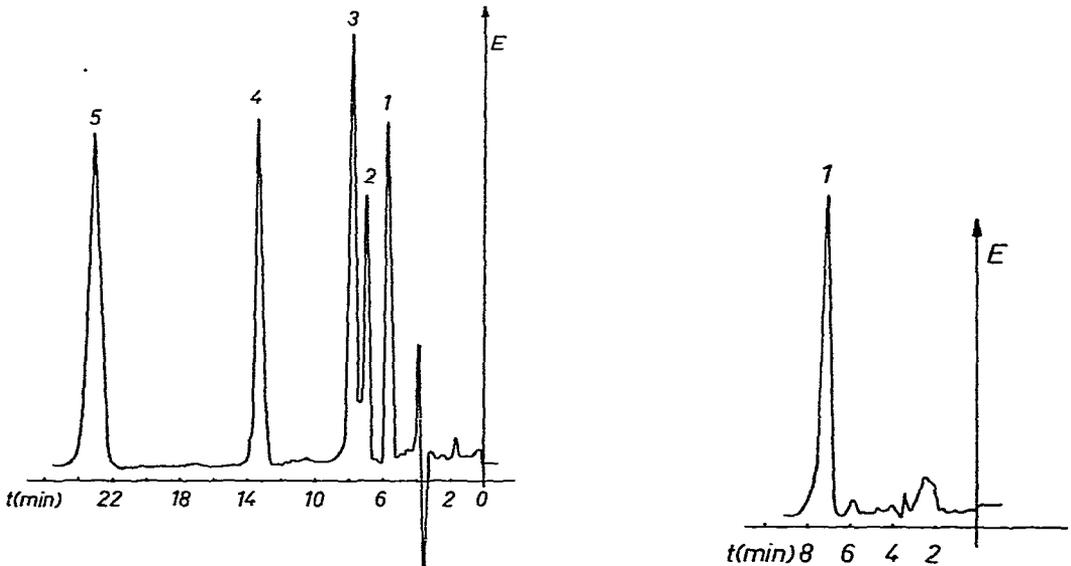


Fig. 3. Auftrennung von Benzophenonen mit Methanol-Wasser (80:20). In Klammern die Retentionszeiten in Minuten. 1 = 5-Nitro-2-aminobenzophenon (5.8); 2 = 2',5-Dichlor-2-aminobenzophenon (7.0); 3 = 5-Chlor-2-aminobenzophenon (7.6); 4 = 5-Chlor-2-methylaminobenzophenon (13.2); 5 = 5-Chlor-2-cyclopropylmethylaminobenzophenon (22.8).

Fig. 4. 1.8 μg Oxazepam (1) pro ml Blut. Laufmittel, Methanol-Wasser (70:30).

aminobenzophenon als auch 5-Chlor-2-methylaminobenzophenon nachgewiesen werden.

DANK

Wir danken Herrn Dr. Kächele für die Durchführung der gaschromatographischen Untersuchungen, Herrn Bogenrieder und Herrn und Frau Baumgartner für die Aufarbeitung der Proben. Den Firmen Hoffmann-La Roche AG, Hoechst AG und Dr. Karl Thomae GmbH danken wir für die freundliche Überlassung der Reinstoffen.

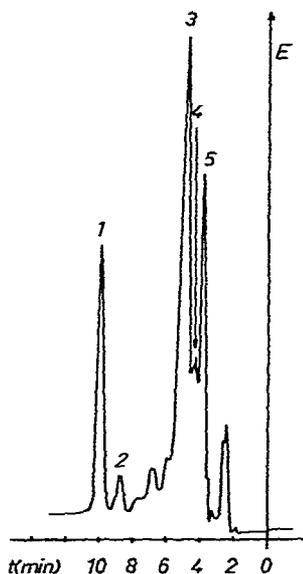


Fig. 5. 1.2 μg Diazepam (1) und 0.2 μg Oxazepam (2) pro ml Blut. Laufmittel, Methanol-Wasser (70:30). Zusätzlich noch Aminophenazon (3), dessen Metaboliten 4-Aminoantipyrin (4) und 4-Acetylaminoantipyrin (5).

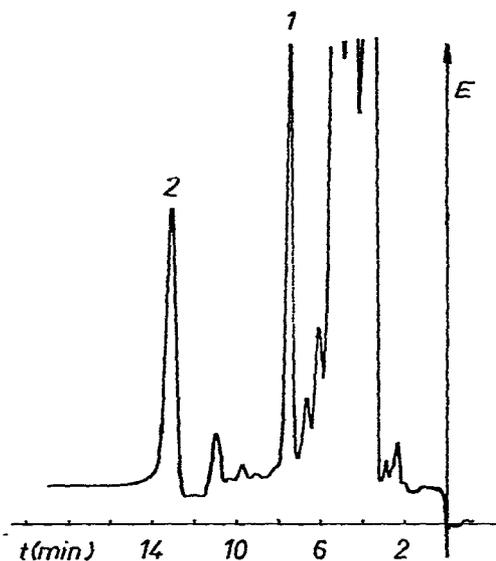


Fig. 6. Nachweis von 5-Chlor-2-aminobenzophenon (1) und 5-Chlor-2-methylaminobenzophenon (2) im Urin nach Hydrolyse. Laufmittel, Methanol-Wasser (80:20).

ZUSAMMENFASSUNG

Es sind Bedingungen für die Auftrennung von Benzodiazepinen und deren Hydrolysenprodukte, den Benzophenonen, im Routinebetrieb durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in umgekehrter Phase entwickelt worden. Die Ergebnisse lassen sich für die qualitative und die quantitative Bestimmung von Benzodiazepinen und Benzophenonen in biologischem Material anwenden, was an Beispielen in Blut und Urin gezeigt wird.

LITERATUR

- 1 H. P. Büch und U. Büch, in W. Forth, D. Henschler und W. Rummel (Herausgeber), *Hypnotika und Sedativa in allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich, 1975, S. 396.
- 2 U. H. Peters und M. Seidel, *Arzneim.-Forsch.*, 20 (1970) 876.
- 3 J. A. F. de Silva, B. A. Koechlin und G. Bader, *J. Pharm. Sci.*, 55 (1966) 692.
- 4 J. Bäumlner und S. Rippstein, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2208.
- 5 J. F. Cano, L. Vignoli und A. Viala, *Ann. Pharm. Fr.*, 25 (1967) 697.
- 6 D. M. Hailey, *J. Chromatogr.*, 98 (1974) 527.
- 7 G. G. Scott und P. Bommer, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 440.
- 8 K. Macek und V. Řehák, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 182.
- 9 M. L. Chan, Ch. Whetsell und J. D. Mechesney, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 515.
- 10 D. H. Rogers, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 742.
- 11 J. Breiter, R. Helger und H. Lang, *Forens. Sci.*, 7 (1976) 131.
- 12 K. H. Beyer, *Mitteilungsbl. GDCh (Ges. Deut. Chem.) Fachgruppe Lebensmittelchem. Gerichl. Chem.*, 28 (1974) 30.
- 13 J. J. Kirkland, *Analyst (London)*, 99 (1974) 859.