

Herkunftsbestimmung von Arzneimitteln durch Messung von natürlichen Isotopenverhältnissen: D/H und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Verhältnisse einiger Proben von Diazepam

Determination of the Origin of Drugs by Measuring Natural Isotope Contents:

D/H and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios of Some Diazepam Samples

Peter Bommer *, Heribert Moser **, Willibald Stichler **

Peter Trimborn ** und Walter Vetter *

* Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

und

** Institut für Radiohydrometrie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Neuherberg bei München

(Z. Naturforsch. 31 c, 111–114 [1976]; eingegangen am 4. Dezember 1975)

Carbon-13, Deuterium, Diazepam, Origin of Drug

The precise determination of the natural isotopic abundance ratios of carbon and hydrogen in several production batches of the commercial product 7-chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (diazepam) gave results which allowed certain batches to be differentiated.

The differences in the ratios appear to be mainly due to differences in the isotopic composition of the (fossile) starting materials of the synthesis.

The measurement of the natural isotopic ratios may therefore offer another possibility to determine the origin of a drug.

Einführung

Isotopenmethoden werden in großem Umfang verwendet, um einen Einblick in die Herkunft und den Syntheseweg chemischer Stoffe zu erhalten^{1–4}. So läßt sich z.B. durch Messung des Deuterium-Wasserstoff-Verhältnisses feststellen, ob etwa Äthylalkohol durch Gärung gewonnen oder synthetisch aus fossilem Kohlenstoff und Wasser erzeugt wurde⁵. Es ist jedoch zu erwarten, daß auch feinere Unterscheidungen chemischer Produkte möglich sind, weil chemische und physikalische Prozesse in der industriellen Fertigung Isotopieeffekte aufweisen und außerdem die verwendeten fossilen Ausgangsstoffe auf Grund ihrer natürlichen Vorgeschichte durch bestimmte unterschiedliche Isotopenverhältnisse gekennzeichnet sind.

Es sollte daher umgekehrt auch möglich sein, Proben einer chemischen Verbindung mit Isotopenverhältnismessungen nach ihrer Herkunft zu unterscheiden.

Untersuchungssubstanz und Meßtechnik

Zur grundsätzlichen Prüfung der Frage, wieweit eine Isotopenanalyse die Unterscheidung verschie-

dener Proben eines chemischen Produktes ermöglicht, erschien es uns interessant, ein Arzneimittel zu verwenden, das in verschiedenen Verabreichungsformen weltweit im Handel ist. Aus diesem Grunde wurde als Testsubstanz Diazepam* (1) gewählt, das unter der Markenbezeichnung Valium seit mehreren Jahren verwendet wird. Die untersuchten Proben stammen aus verschiedenen Chargen, die von der Firma F. Hoffmann-La Roche entweder in der Schweiz oder in USA produziert wurden (im folgenden als Roche-Schweiz bzw. Roche-USA bezeichnet). Die Syntheseverfahren sind an beiden Orten grundsätzlich gleich, unterscheiden sich aber in Details, wie Lösungsmitteln, Temperaturen und Reaktionsdauer sowie Aufarbeitungsprozeduren, die in verschiedenen Stufen verwendet werden. Obgleich der generelle Syntheseweg (Abb. 1) im Laufe der Jahre beibehalten wurde, kam es doch im exakten Verlauf der Synthese zu zahlreichen Abänderungen, z.B. in der Zusammensetzung von Lösungsgemischen, Reaktionstemperaturen etc.

Bei den untersuchten Chargen fand kein Austausch irgendwelcher Produkte zwischen Roche-Schweiz und Roche-USA statt. Die Märkte, auf denen die Ausgangsstoffe bezogen wurden, waren für die Schweiz und USA verschieden. Die Vorge-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Heribert Moser, Ingolstädter Landstr. 1, D-8042 Neuherberg.

* Diazepam, 7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

schichte der Ausgangsstoffe, also z. B. die Frage nach den Lagerstätten, aus denen die fossilen Vorstufen dieser Stoffe stammen, ist unserer Nachprüfung nicht zugänglich.

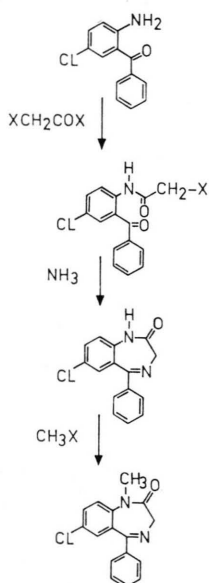


Abb. 1.
Allgemeines
Schema
der Synthese
von Diazepam.

Die Messung der Isotopenverhältnisse wurde am Wasserstoff (D/H) und Kohlenstoff (C-13/C-12) vorgenommen. Die Auswahl dieser Elemente war durch meßtechnische Gründe und die relativ große natürliche Streuung der genannten Isotopenverhältnisse bestimmt. Zur Präparation für die massenspektrometrische Isotopenverhältnismessung wurden die Diazepam-Proben zunächst in einem abgeschlossenen System quantitativ in reiner Sauerstoffatmosphäre verbrannt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt H_2O nach dem in l. c. 6 angegebenen Verfahren quantitativ über heißem Zink zu H_2 reduziert. Die so präparierten Gase CO_2 und H_2 wurden in speziell für Isotopenverhältnismessungen eingerichteten Massenspektrometern (Varian MAT, Typ M 86 bzw. GD 150) mit Isotopenstandards verglichen. Die Meßergebnisse (δ -Werte) sind daher in ‰ Abweichung von diesen Standards angegeben, welche wie folgt definiert sind:

$$\delta D \text{ bzw. } \delta^{13}\text{C} = \frac{R_{\text{Probe}} - R_{\text{Standard}}}{R_{\text{Standard}}} \cdot 1000\text{‰},$$

wobei R_{Probe} bzw. R_{Standard} die Isotopenverhältnisse D/H bzw. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in den Proben bzw. im Standard bedeuten.

Für die Deuteriummessungen wurde, wie international üblich, der Meerwasserstandard „SMOW“⁷, für die C-13-Messung der Kalkstein-Standard PDB⁸ verwendet. Jede Probe wurde zweimal nach dem beschriebenen Verfahren präpariert und gemessen.

Auf Grund der Abweichungen der jeweils gewonnenen Ergebnisse ergab sich für die C-13-Messung eine geschätzte Standardabweichung σ von $\pm 0,3\text{‰}$, für die Deuteriummessung von $\pm 3\text{‰}$.

Meßergebnisse und Diskussion

Die experimentellen Ergebnisse sind graphisch in den Abb. 2 und 3 wiedergegeben. Die Proben stammen aus verschiedenen Chargen der Produktion der letzten Jahre von Roche-Schweiz und Roche-USA. Mit Ausnahme des Jahres 1972 mit vier Chargen der Schweizer Produktion wurde aus je-

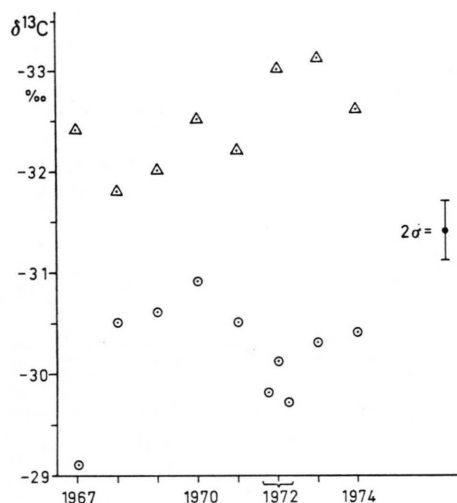


Abb. 2. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis einzelner Chargen von Diazepam aus der Produktion der letzten Jahre von Roche-Schweiz und Roche-USA. Δ , δ -Werte von Diazepam von Roche-USA; \odot , δ -Werte von Diazepam von Roche-Schweiz. St.-Abw. = $\pm 0,3\text{‰}$.

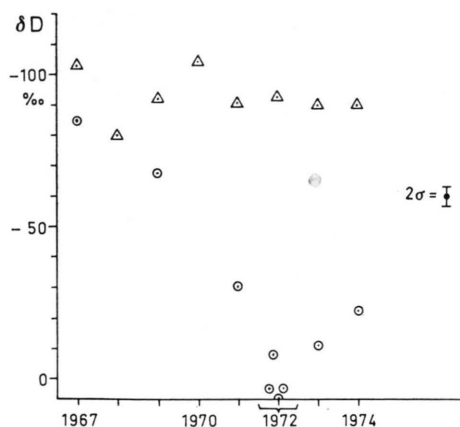


Abb. 3. D/H-Isotopenverhältnis einzelner Chargen von Diazepam aus der Produktion der letzten Jahre von Roche-Schweiz und Roche-USA. Δ , δ -Werte von Diazepam von Roche-USA; \odot , δ -Werte von Diazepam von Roche-Schweiz. St.-Abw. = $\pm 3\text{‰}$.

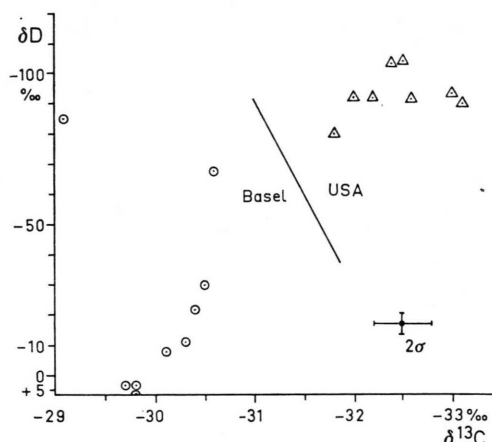


Abb. 4. D/H- und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse einzelner Chargen von Diazepam aus der Produktion der letzten Jahre von Roche-Schweiz und Roche-USA.

dem Jahr nur eine Charge gemessen. Abb. 4 faßt die Ergebnisse der Wasserstoff- und Kohlenstoffisotopenmessungen zusammen.

Die Isotopenverhältnisse in einer synthetisch erzeugten Substanz sind festgelegt durch a. das Isotopenverhältnis der Ausgangsstoffe, b. die kinetischen Isotopeneffekte in den einzelnen Synthesestufen, c. Fraktionierungseffekte während der Aufarbeitung (z.B. bei Destillationen etc.), d. Isotopenaustausch mit anderen Stoffen (z.B. Lösungsmitteln) während der Synthese.

Im Fall des Diazepam ist folgendes festzustellen:

zu a. Die Isotopenverhältnisse der Ausgangsstoffe von Roche-Schweiz und Roche-USA sind unbekannt. Als Grenzwerte des Bereiches, in dem sie liegen können, müssen die Grenzwerte der fossilen Lagerstätten bzw. des Wassers der Erde angesehen werden: -150 bis $+200\text{‰}$ für δD , -20 bis -33‰ für $\delta^{13}\text{C}$ ¹.

zu b. Bedeutende kinetische Isotopeneffekte treten im allgemeinen nur bei unmittelbar an der Reaktion beteiligten Atomen auf; sekundäre Isotopeneffekte sind nur in geringem Ausmaß zu erwarten.

Bezüglich des Kohlenstoffisotopenverhältnisses kommt es in der Synthese insgesamt nur an vier Kohlenstoffatomen des Gerüsts zu chemischen Veränderungen, also zur möglichen kinetischen Verschiebung von Isotopenverhältnissen (s. auch Fußnote S. 114). Die bei chemischen Reaktionen für ^{13}C gefundenen maximalen Isotopeneffekte liegen bei $1,034$ ¹. In unserem Falle werden die beobachtbaren kinetischen Isotopeneffekte durch drei Um-

stände verkleinert. Erstens mißt man nur den Durchschnittswert aller 16 Kohlenstoffatome des Moleküls, so daß ein Verdünnungseffekt um einen Faktor 16 eintritt. Zweitens laufen alle Reaktionen in hoher Ausbeute ab, ein Umstand, der den Isotopeneffekt im Extremfall, bei 100-prozentiger Ausbeute, ganz zum Verschwinden bringen würde. Und schließlich reduziert die Ähnlichkeit der Synthesen der einzelnen verglichenen Chargen die Möglichkeit von Unterschieden in Isotopeneffekten drastisch.

Kombiniert man alle diese Einschränkungen, so kommt man zum Schluß, daß eine Änderung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes der einzelnen Chargen durch einen Unterschied im kinetischen Isotopeneffekt bei den einzelnen Synthesen kaum meßbar sein dürfte, jedoch sicher $<1\text{‰}$ ist.

Dieselben Überlegungen gelten auch für das Isotopenverhältnis des Wasserstoffs. Allerdings sind hier wesentlich größere maximale Isotopeneffekte gemessen worden als bei Kohlenstoff, wenn im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion eine Wasserstoffbindung gelöst wird. Im Rahmen der vorliegenden Synthese ist dies jedoch in keiner Stufe der Fall. Der zu erwartende Effekt ist schwierig abzuschätzen, dürfte aber höchstens in der Größenordnung der Meßgenauigkeit (3‰) liegen.

zu c. Fraktionierungseffekte sollten in Anbetracht der großen Masse der untersuchten Moleküle und des geringen Massenunterschiedes von einer Einheit (ein D statt ein H, oder ein ^{13}C statt eines ^{12}C pro Molekül) nicht in merklicher Größe auftreten, zumal Fraktionierungen aller Art in einem Syntheseverfahren, das hohe Ausbeuten anstrebt, ohnehin vermieden werden.

zu d. Der Austausch eines Kohlenstoffs aus einer der in der Synthese verwendeten Verbindungen mit z.B. Lösungsmitteln ist ausgeschlossen, so daß auf diese Weise das vorgegebene $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis nicht verändert werden kann. Im Gegensatz dazu könnte es bei sauren oder basischen Bedingungen unter Umständen zum Austausch von Wasserstoffatomen an den aromatischen Kernen und der CH_2-CO -Gruppe gegen acide Wasserstoffe des Lösungsmittels kommen. Da das D/H-Verhältnis im natürlichen Wasser zwischen $+10$ und -150‰ schwankt¹, ist in einem solchen Fall eine starke Veränderung der δD -Werte durchaus möglich.

Faßt man alle Argumente zusammen, so ist zu vermuten, daß das Verhältnis der Kohlenstoffisotope in Diazepam im wesentlichen schon durch das Ver-

hältnis in den Ausgangsprodukten der Synthese festgelegt ist*. Das Isotopenverhältnis des Wasserstoffs dagegen könnte gegenüber dem der Ausgangsprodukte durch Austauschreaktionen mit LösungsmitteIn stark verändert sein, wobei das Ausmaß des Austausches von Details der Synthese (p_{H} und Temperatur) stark abhängen dürfte.

Die von uns gefundenen Meßergebnisse lassen demnach folgende Schlüsse zu:

a. Kohlenstoff:

Alle Werte der Produkte von Roche-Schweiz liegen innerhalb einer Spanne von $\Delta\delta^{13}\text{C} = 2,1\text{‰}$, was auf die Meßgenauigkeit bezogen, 7σ entspricht. Alle Werte der Produktion von Roche-USA liegen in einem Bereich von noch etwas kleinerer Breite, $\delta^{13}\text{C} = 1,3\text{‰}$. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Produktion von Roche-USA und Roche-Schweiz ist $2,4\text{‰}$, wobei der tiefste Wert der Produktion von Roche-USA von $0,9\text{‰}$, also 3σ über dem Wert der höchsten Charge von Roche-Schweiz liegt. Offensichtlich ist es daher möglich, die gesamte Produktion von Roche-Schweiz von jener von Roche-USA auf Grund des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses zu unterscheiden.

Eine Unterscheidung einzelner Chargen, die von derselben Produktionsstätte stammen, ist dagegen offenbar schwierig, da alle Werte relativ nahe beisammen liegen. Hinzu kommt, daß nur ein kleiner Teil der Gesamtzahl der Produktions-Chargen analysiert wurde: Hätte man alle verwendet, wären beide Bänder viel dichter belegt und damit zahlreiche Chargen nicht mehr unterscheidbar.

b. Wasserstoff:

Während die Produktion von Roche-USA in einem relativ schmalen Band von $\Delta\delta\text{D} = 24\text{‰}$, entsprechend 8σ , liegt, tritt bei der Schweizer Ware offensichtlich ein zeitlicher Trend auf: Die alten Werte der Jahre vor 1970 liegen fast auf der Höhe

der Werte von Roche-USA, während die neueren sich am unteren Ende sammeln. Das bedeutet, daß die Produkte von Roche-USA und Roche-Schweiz erst ab 1970 völlig klar durch ihre D/H-Isotopenverhältnisse unterschieden werden können. Andererseits scheint eine Unterscheidung mancher Chargen von Roche-Schweiz untereinander möglich, doch muß wieder darauf hingewiesen werden, daß es sich bei den vorliegenden Meßpunkten nur um eine kleine Auswahl der tatsächlich vorhandenen Chargen handelt. Eine Unterscheidungsmöglichkeit für alle Chargen scheint daher auch hier nur beschränkt möglich. Die bei der Schweizer Produktion sich ergebenden größeren Unterschiede in den δD -Werten gegenüber den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten müssen im Sinne eines verschiedenen Isotopenaustausches, verursacht durch unterschiedliche Bedingungen bei der Synthese, oder eines unterschiedlichen Isotopengehalts des Ausgangsmaterials, gedeutet werden.

Eine Kombination beider Werte, wie sie in Abb. 4 dargestellt ist, verbessert natürlich sowohl die Sicherheit der Unterscheidung zwischen Proben verschiedener Herkunft als auch die Chance, zwei Chargen gleicher Herkunft unterscheiden zu können.

Die Verarbeitung von Diazepam zu irgendeiner Verabreichungsform und die Rückgewinnung aus Handelspräparaten wie Ampullen-Lösungen oder Tabletten etc. haben keinen Einfluß auf das Isotopenverhältnis, vorausgesetzt, daß extreme Bedingungen, die zum Austausch von Wasserstoffatomen führen würden, vermieden werden.

Die Isotopenverhältnisse können daher, neben dem üblichen Nachweis bestimmter Verunreinigungen, zur Bestimmung der Herkunft von Arzneimitteln mit guter Aussicht auf Erfolg herangezogen werden.

Für die kritische Durchsicht des Manuskriptes danken wir Herrn Professor Dr. H. Simon sehr herzlich.

Die Proben stammen aus den Referenzmusterlagern von Roche-Schweiz und Roche-USA. Frau Dr. J. Sheridan und Dr. N. Rigassi sind wir für Beschaffung und Auswahl dieser Proben zu besonderem Dank verpflichtet.

* Die Verfolgung der Isotopenverhältnisse der Ausgangsprodukte durch deren Synthese und weiter durch die Aufbereitung ihrer (vermutlich) fossilen Ausgangsprodukte bis zu deren Lagerstätten liegt außerhalb unserer Möglichkeiten.

¹ H. Kienitz, Massenspektrometrie, p. 639, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1968.
² J. H. Beynon, Mass Spectrometry, p. 58, Elsevier Publishing Company 1960.
³ N. A. Matwiyoff and D. G. Ott, Science **181**, 1125 [1973].
⁴ H. Sulzer, Isotope im Dienste der Lebensmittelkontrolle. — Technische Beilage der „Neuen Zürcher Zeitung“, 2. April 1975.

⁵ J. Bricout, J. Ch. Fontes, R. Letolle, A. Mariotti, and L. Merlivat, Isotope Ratios as Pollutant Source and Behaviour Indicators, p. 359–372, IAEA, Vienna 1975.

⁶ W.-E. Schiegl and I. C. Vogel, Earth Planet. Sci. Lett. **7**, 307–313 [1970].

⁷ H. Craig, Science **133**, 1833 [1961].

⁸ H. Craig, Geochim. Cosmochim. Acta **12**, 133–149 [1957].