

Nachweis von Clobazam (Frisium®) in biologischem Material*

G. Sticht und H. Käferstein

Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln, Melatengürtel 60–62, D-5000 Köln 30,
Bundesrepublik Deutschland

Detection of Clobazam (Frisium®) in Biological Material

Summary. A combined method of HPLC and TLC is described which allows identification and quantitative determination of clobazam (Frisium®) in body fluids after therapeutical dosage. The procedure is sensitive and highly specific by means of hydrolysis of clobazam to a diphenylamine derivative, which is detected on thin layer plate by a color reaction. Clobazam detection in serum is possible for at least 24 hours after a single dose of 10mg clobazam detection in serum is practicable.

Key words: Clobazam, Detection – Benzodiazepine, Clobazam.

Zusammenfassung. Es wird eine kombinierte hochdruckflüssigkeits- und dünn-schichtchromatographische Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Clobazam (Frisium®) in Körperflüssigkeiten nach Einnahme therapeutischer Dosen vorgestellt. Das Nachweisverfahren zeichnet sich insbesondere durch seine große Nachweisempfindlichkeit, seine Reproduzierbarkeit sowie hohe Spezifität durch die Koppelung der HPLC mit einer spezifischen Farbreaktion nach Hydrolyse aus. Mindestens 24 Stunden nach Einnahme einer Einzeldosis von 10 mg Clobazam gelingt im Serum der Nachweis einwandfrei.

Schlüsselwörter: Clobazam, Nachweis – Benzodiazepine, Clobazam.

Die Einführung neuer Arzneimittel zwingt den Analytiker zur Ausarbeitung von Nachweismethoden, die möglichst in den bisherigen Analysengang ohne großen Aufwand eingebaut werden sollten. Dennoch ist es nicht zu vermeiden, daß die Untersuchungs-gänge immer aufwendiger werden.

Dies läßt sich besonders deutlich an den Psychopharmaka aus der Benzodiazepin-reihe verfolgen. Die zunächst entwickelten, Diazepam und Chlordiazepoxid, konnten durch Chromatographie ihrer Hydrolyseprodukte – der Benzophenone – unterschieden

* Herrn Prof. Dr. G. Dotzauer zum 65. Geburtstag gewidmet

Wir danken der Fa. Hoechst AG 6230 Frankfurt (M) 80 für die freundliche Überlassung der Rein-substanz

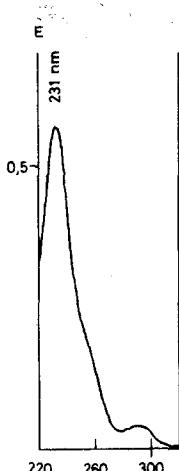


Abb. 1. UV-Spektrum von Clobazam in Acetonitril (4 µg/ml). Schichtdicke 1,00 cm

werden. Nach Einführung weiterer Psychopharmaka, die die gleichen Hydrolyseprodukte ergaben, wurde eine Differenzierung erst durch die wesentlich aufwendigere Analyse der Benzodiazepine selbst möglich. Dalmadorm® und Lexotanil® sind ebenfalls 1,4-Benzodiazepine. Die bei der Hydrolyse entstehenden Benzophenone können jedoch im Gegensatz zu den früheren nicht im Laufmittel Benzol chromatographiert werden. Aus dem im Dezember 1977 in der Bundesrepublik Deutschland eingeführten Frisium®, dem ersten 1,5-Benzodiazepin, kann ein Benzophenon durch Hydrolyse nicht entstehen. Somit ist diese einfache und empfindliche Nachweismethode bei Frisium nicht anzuwenden.

Aufgrund der Strukturähnlichkeit schienen zum Clobazannachweis ähnliche Methoden wie bei Diazepam für die empfindliche Bestimmung in biologischem Material anwendbar. Hier wären Gas- und Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu nennen. Hajdú et al. machen u. a. Angaben zur Gaschromatographie mit Diazepam als innerem Standard.

1. Quantitative Bestimmung von Clobazam aus biologischem Material mittels HPLC

a) *Nachweis mittels HPLC.* Clobazam zeigt im UV-Licht eine sehr starke Absorption. Abbildung 1 gibt das UV-Spektrum einer Lösung von Clobazam in Acetonitril wieder.

Das Hauptmaximum liegt bei 231 nm, das Minimum bei 278 nm und ein weiteres, schwach ausgeprägtes Maximum bei 290 nm. Der molare Extinktionskoeffizient für 231 nm wurde zu 43980 berechnet ($E\ 1\% \ 1\text{ cm} = 1462$). Aus diesem Grunde erscheint Clobazam für eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Analyse mit einem UV-Detektor gut geeignet. Es wurde mit dem Gerät 1010 B der Fa. Hewlett Packard gearbeitet. Die Chromatographie erfolgte auf LiChrosorb Rp 8 10 µ der Fa. Merck. Säulenlänge 250 mm, innerer Durchmesser 3 mm. Chromatographiebedingungen: Acetonitril (Azeotrop) 0,8 ml/Min., 0,002 N Schwefelsäure, 0,4 ml/Min. Druck 48 kp/cm². Säulentemperatur 40°C, Retentionszeit für Clobazam 2,2 Min. Die Detektion erfolgte bei 230 nm.

Abbildung 2 zeigt die lineare Beziehung zwischen injizierten Substanzmengen im Bereich von 0,01–0,25 µg und Peakhöhen. Werden 0,05 µg und 0,1 µg mehrfach aufgegeben, so errechnet sich eine Standardabweichung von unter 2 %.

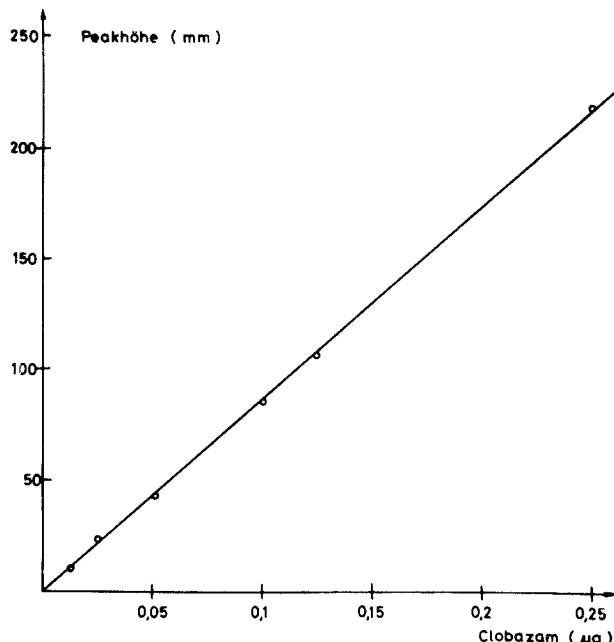


Abb. 2. Abhängigkeit der Peakhöhe von der injizierten Probenmenge. Verstärkung 0,2

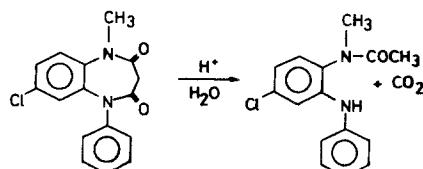


Abb. 3. Saure Hydrolyse von Clobazam zu 5-chlor-2-(N-Methyl-acetamido)-diphenylamin

b) Aufarbeitung von biologischem Material. Clobazam ist in Wasser schlecht löslich. Die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aus Serum und Urin gelingt in saurem, neutralem und alkalischem Milieu. Die besten Ergebnisse, insbesondere die saubersten Extrakte werden auf folgende Weise erzielt:

Man pipettiert 1 g Serum oder Urin in ein 8 ml Schliffzentrifugenglas und alkalisiert mit 0,1 ml 2 N NaOH. Es wird mit 5 ml Chloroform 1 Minute geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgezogen, das ausgefallene Protein mit einem Spatel zur Seite gedrückt und das Chloroform quantitativ in ein anderes 8 ml Gläschen überführt. Man spült mit 1 ml Chloroform nach und dampft die organische Phase durch Überblasen von Luft zur Trockne ein. Der Rückstand wird in 50 μl Acetonitril gelöst. 5 μl werden in den Flüssigkeitschromatographen injiziert. Bei einem Zusatz von jeweils 1 μg Clobazam zu 1 g Serum ergab sich eine Wiederfindungsrate von 89 %. Die relative Standardabweichung betrug weniger als

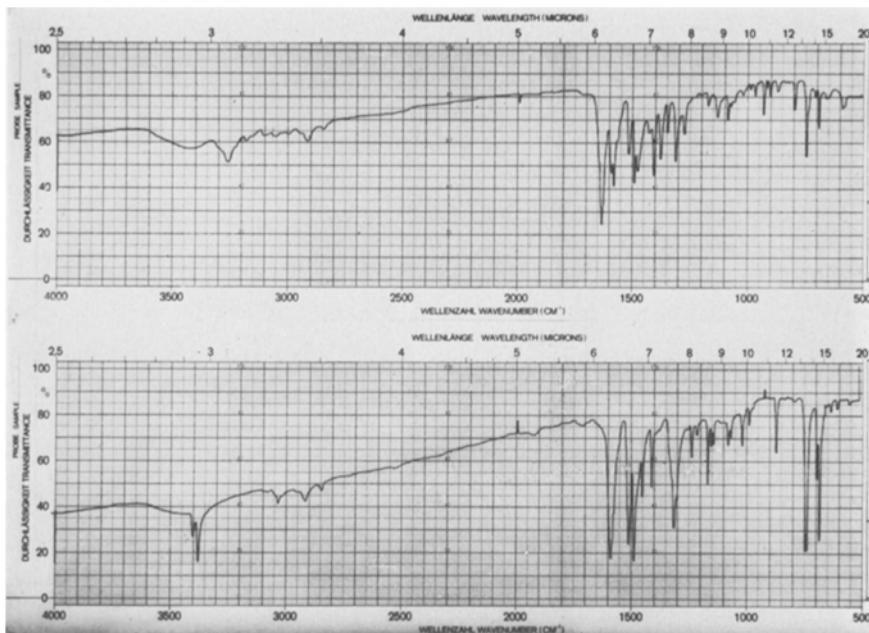


Abb. 4. Infrarotspektren von 5-Chlor-2-(N-methylacetamido)-diphenylamin und Diphenylamin (unten) (KBr-Preßlinge)

4 %. Die Nachweisgrenze wurde mit 0,02 mg/kg bestimmt. Eine zweite Einspritzung der gleichen Probe liegt im Durchschnitt um 5–6 % höher als die erste. Dies ist bei quantitativen Bestimmungen zu berücksichtigen.

2. Hydrolyse von Clobazam

Die für den Nachweis der bisher bekannten Benzodiazepine übliche Hydrolyse mit Salzsäure führt bei Clobazam nach dem in Abbildung 3 wiedergegebenen Reaktionsschema unter Abspaltung von CO₂ zum 5-Chlor-2-(N-methylacetamido)-diphenylamin führen. 100mg (0,333 mMol) Clobazam wurden in 10 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 30 ml Wasser und 10 ml konzentrierter Salzsäure 30 Min. unter Rückfluß erhitzt. Unter Eiskühlung wurde mit konz. NaOH alkalisch gestellt und 3 mal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand aus 98 % Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 43 mg (0,167 mMol) = 50 % d. Th. Fp. 174–176°C.

In Abbildung 4 ist das Infrarotspektrum des Hydrolyseproduktes wiedergegeben und zum Vergleich das Spektrum von Diphenylamin, dem Grundkörper des Clobazam-spaltproduktes. Beide reagieren in konz. H₂SO₄ mit Nitrit zu einem blau gefärbten Komplex. Als Reagenz dient konzentrierte Schwefelsäure (100 ml), in die unter Rühren und Eiskühlung 5 g KNO₂ eingetragen wird, (Liebermann-Reagenz).

In Abbildung 5 sind die Spektren der Komplexe beider Verbindungen im Bereich zwischen 380–760 nm aufgezeichnet. Es wird die Ähnlichkeit der Absorptionseigenschaften der gebildeten Farbstoffe deutlich. Der Farbkomplex des Hydrolyseproduktes

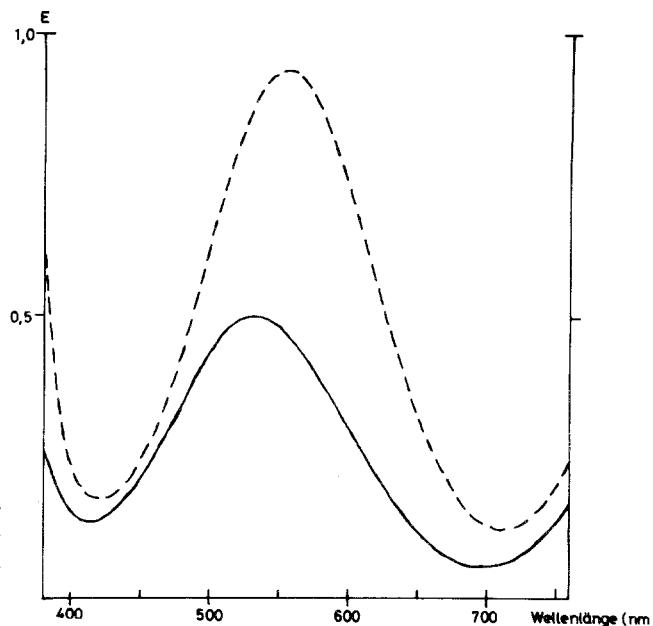


Abb. 5. Absorptionsspektren der Farbkomplexe von 2-Methylamino-5-chlor-diphenylamin (10 µg): — und Diphenylamin: (5 µg) - - - in 1 ml Schwefelsäure-Nitrit-Reagenz

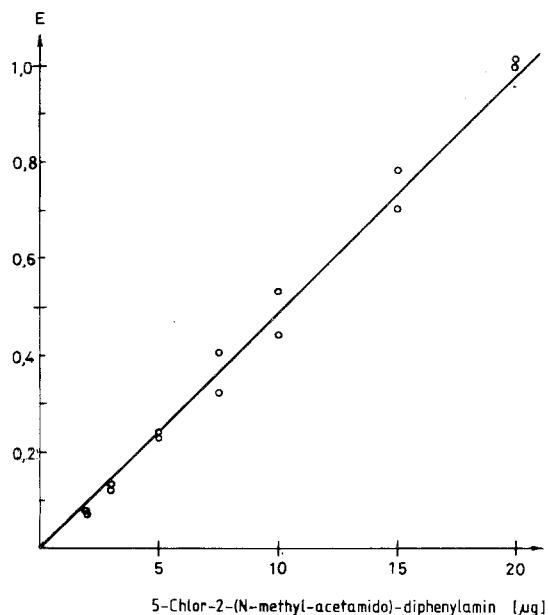


Abb. 6. Lineare Beziehung zwischen Extinktion und 2-Methylamino-5-chlor-diphenylamin-Menge in 1 ml Schwefelsäure-Nitrit-Reagenz

hat das Absorptionsmaximum bei 530 nm, während dasjenige von Diphenylamin bei 555 nm liegt.

Abbildung 6 gibt die lineare Beziehung zwischen der Extinktion des Farbkomplexes und dem eingesetzten 5-Chlor-2-(N-methyl-acetamido)-diphenylamin wieder. Nachweisgrenze 1 µg.

3. Dünnschichtchromatographische Identifikation von Clobazam (als 5-Chlor-2-(N-methyl-acetamido)-diphenylamin)

Als noch wesentlich empfindlicher erweist sich die Farbreaktion auf der Dünnschichtplatte. Es wird auf Fertigplatten F 254 (Merck) im Laufmittel Cyclohexan/Aceton/Eisessig (40 + 40 + 0,5 V/V/V) chromatographiert. Beim Besprühen mit dem Schwefelsäure-Nitrit-Reagenz erscheinen violette Flecken auf weißem Untergrund. 0,05 µg hydrolysiertes Clobazam sind noch eindeutig nachweisbar (Rf 0,60).

Da bei therapeutischen Dosierungen die Konzentrationen in Serum und Urin gering sind, kommt für dieses Untersuchungsmaterial nur der DC-Nachweis des Clobazamspaltproduktes in Betracht. Zweckmäßigerweise hydrolysiert man die Proben nach der flüssigkeitschromatographischen Untersuchung. Die Hydrolyse von Serum und Urin ohne Vorreinigung ergibt zu stark verunreinigte Extrakte. Mit dem Reagenz treten dann starke braun-gelbe Farbtöne auf, die die violetten Flecken überdecken.

Man löst in 50 µl Methanol und versetzt mit 1 ml Salzsäurereagenz (10 ml konzentrierte HCl + 40 ml H₂O). Unter Rückfluß wird 30 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Probe wird im Eisbad gekühlt und mit 200 µl 40 % NaOH alkalisch gestellt. Es wird mit 3 ml CHCl₃ extrahiert, nach Zentrifugation die wäßrige Phase verworfen und die organische Phase in ein anderes Gläschen überführt und zur Trockne eingedampft. Man trägt quantitativ auf eine DC-Platte auf und chromatographiert in dem angegebenen System.

4. Nachweis von Clobazam aus Serum und Urin bei Einnahme therapeutischer Dosen

Zwei männliche Versuchspersonen nahmen 10 mg Clobazam, drei weitere (2 männl., 1 weibl.) 20 mg. In den letzten Tagen vor dem Versuch wurden keine anderen Medikamente eingenommen. Alle hatten noch nie Clobazam genommen. Der Konzentrationsverlauf im Serum ist in Tabelle 1 dargestellt.

Obwohl nur geringe Spiegel auftreten, ist auch bei therapeutischen Dosierungen der Nachweis einwandfrei möglich (Abb. 7).

Selbst 24 Stunden nach Einnahme lässt sich Clobazam im Serum bei allen Versuchspersonen noch quantitativ bestimmen. Neben Clobazam tritt eine weitere Komponente auf, deren Konzentration während des Untersuchungszeitraumes stetig zunimmt. 24 Stunden nach Einnahme kann die Peakhöhe mit der von Clobazam vergleichbar sein (Retentionszeit 1,9 Minuten). Es handelt sich offenbar um das Demethylierungsprodukt Clofazin, das nach Hajdú et al. der Hauptmetabolit im Serum ist.

Im Urin wird Clobazam schlecht ausgeschieden. Nur bei einer Versuchsperson traten meßbare Konzentrationen bis maximal 0,2 µg/g auf. Bei allen anderen lagen die Konzentrationen an oder unter der Nachweisgrenze. Die in der Literatur [1] beschriebenen hydroxylierten Metaboliten, die möglicherweise in relativ hohen Konzentrationen ausgeschieden werden, sowie Clofazin können nach Hydrolyse keinen Farbkomplex wie 5-Chlor-2-(N-methyl-acetamido)-diphenylamin bilden. Daher ist Urin als Untersuchungsmaterial für Screeningsuntersuchungen hier nicht geeignet.

Der Hersteller gibt für das erste in die Therapie eingeführte 1,5-Benzodiazepin an, daß es bei therapeutischer Dosierung eine ausgeprägt anxiolytische Wirkung aufweise, ohne Tagesmüdigkeit zu verursachen. Wachheitszustand, Reaktionsfähigkeit, Konzentrationsvermögen und motorische Koordination seien im allgemeinen nicht beein-

Tabelle 1. Clobazam-Spiegel

Std.	10 mg		20 mg		
	U. P.	U. Z.	H. K.	G. S.	
	männl.	männl.	männl.	männl.	
	80 kg	64 kg	69 kg	84 kg	68 kg
1	n. u.	n. u.	0,37	0,12	0,38
2	0,17	0,23	0,30	0,34	0,27
4	0,12	0,18	0,24	0,21	0,25
6	0,14	0,16	0,21	0,18	0,23
8	0,11	0,14	0,19	0,16	0,14
24	0,05	0,08	0,12	0,12	0,07

n. u. = nicht untersucht

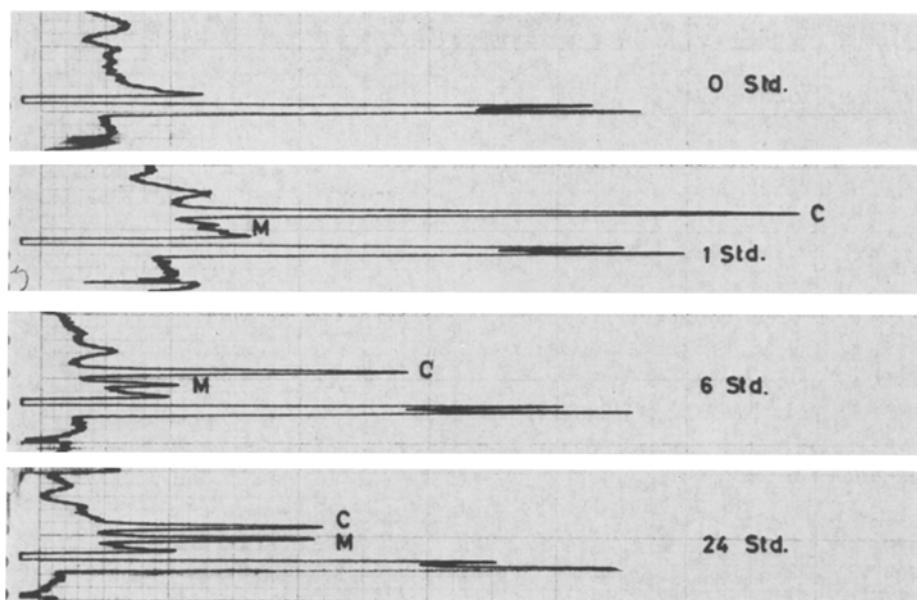


Abb. 7. HPLC-Chromatogramme vor und nach Einnahme von 20 mg Clobazam durch eine 69 kg schwere Versuchsperson. C = Clobazam; M = Metabolit (N-Desmethyl-Clobazam); Verstärkung 0,05

trächtigt. Das Fahrverhalten soll bei Behandlung mit Frisium nicht verändert sein, wenn nach sechstätigiger abendlicher Frisiumeinnahme untersucht wurde [2]. Dennoch kann Frisium – ebenso wie die bisher verwendeten 1,4-Benzodiazepine – in Verkehrsmedizin und Toxikologie eine beachtliche Bedeutung erlangen.

Alle Teilnehmer unserer Versuchsreihe berichteten übereinstimmend von einer Ernüdung, die etwa eine Stunde nach der Einnahme am stärksten ausgeprägt war. Diese Symptome klangen dann wieder ab, obwohl die Serumspiegel sich nur relativ wenig änderten. Zumindest in der Medikamentenanflutungsphase wird eine negative Wirkung auf die Fahrtüchtigkeit nicht ausgeschlossen werden können. Dies gilt besonders auch bei gleichzeitigem Alkoholgenuss. Zusätzlich kann mit Sicherheit von

Bedeutung sein, daß die Wirkung auch anderer, zentral sedierender Pharmaka verstärkt wird. Bei der geringen akuten Toxizität von Clobazam wird jedoch eine Vergiftung mit diesem Wirkstoff allein sicher selten sein.

Wir danken Herrn Dr. H. Schütz, Institut für Rechtsmedizin der Universität Gießen für die Überlassung von Nor-Clobazam (Clofazin)

Literatur

1. Hajdú, P., Uihlein, M., Damm, D.: Clobazam: Physikalisch-chemische und analytische Untersuchungen. *J. Med. Chem.* (in Vorbereitung)
2. Hindmarch, J., Hanks, G. W., Hewett, A. J.: Clobazam, 1,5-Benzodiazepine, and Car-driving ability. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **4**, 573–578 (1977)

Eingegangen am 12. Mai 1978