

## **Analytische Daten des neuen Benzodiazepinderivates Midazolam (Dormicum) und seiner Metaboliten\***

**H. Schütz**

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

### **Analytical Data on the New Benzodiazepine Derivative, Midazolam (Dormicum), and Its Metabolites**

**Summary.** The article describes analytical data for the detection of midazolam,  $\alpha$ -hydroxymidazolam, 4-hydroxymidazolam and  $\alpha$ ,4-dihydroxymidazolam, as well as important pharmacokinetic properties. Extraction from biological specimens is also reported.

**Key words:** Midazolam, analytical data – Dormicum, analytical data

**Zusammenfassung.** In der Arbeit werden analytische Daten zum Nachweis von Midazolam,  $\alpha$ -Hydroxi-midazolam, 4-Hydroxi-midazolam und  $\alpha$ ,4-Dihydroxi-midazolam sowie wichtige pharmakokinetische Eigenschaften mitgeteilt. Weiterhin wird über die Extraktion aus biologischem Material berichtet.

**Schlüsselwörter:** Midazolam, analytische Daten – Dormicum, analytische Daten

Vor einiger Zeit wurde mit Midazolam (I) (Ro 21-3981; Dormicum) ein neues 1,4-Benzodiazepin entwickelt, bei dem die hypnotische Komponente im Wirkungsspektrum herausragt. Daneben besitzt Midazolam (I) jedoch auch anxiolytische, antikonvulsive und muskelrelaxierende Eigenschaften. Besonders bemerkenswert ist die extrem kurze Eliminationshalbwertszeit von ca. 2 Std, die mit einer kurzen Wirkdauer korreliert. Aufgrund des basischen Stickstoffs in Position 2 des Imidazolrings lassen sich von Midazolam (I) wasserlösliche Salze gewinnen (z.B. Maleate oder Hydrochloride). Dies hat den Vorteil, daß bei der Herstellung von injizierbaren Zubereitungen auf organische Lösungs-

\* Herrn Dr. James Bäuml (Basel) zum 60. Geburtstag gewidmet

vermittler verzichtet werden kann, die oft Ursache für Schmerzen an der Injektionsstelle oder gar Thrombophlebitiden sind. Midazolam (I) steht in der Bundesrepublik<sup>1</sup> bislang nur zur parenteralen Applikation (i.v. oder i.m.) zur Verfügung, da nach peroraler Gabe starke interindividuelle Resorptionsschwankungen beobachtet wurden [19] und wird hauptsächlich zur Narkoseinduktion bzw. Sedierung vor chirurgischen Eingriffen eingesetzt. Midazolam wirkt, wie alle Benzodiazepine, als inhibitorischer Transmitter und verstärkt prä- und postsynaptische Hemm-Mechanismen über Benzodiazepin-spezifische Rezeptoren an Synapsen mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). Weitere Einzelheiten zur Pharmakologie und Klinik s. [2–5, 7, 9–12, 19, 20].

Strukturchemisch besteht eine enge Verwandtschaft mit Triazolam (Halcion) und Alprazolam (Xanax, Tafil), da auch Midazolam (I), zwischen den Positionen 1 und 2 des 1,4-Benzodiazepingerüsts ein 5-gliedriges Ringsystem besitzt, das hauptsächlich Ursache für die pharmakokinetischen Eigenschaften (kurze Eliminationshalbwertszeit u. a.) ist. In der vorliegenden Arbeit soll über wichtige pharmakokinetische und analytische Daten berichtet werden.

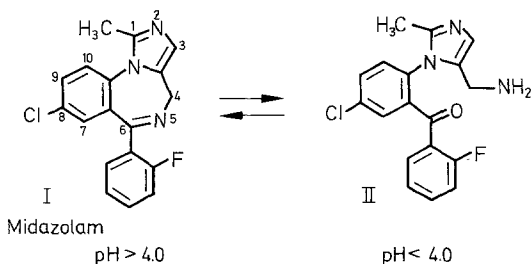
### Allgemeine Daten und Eigenschaften

**Midazolam (I)** (8-Chlor-6-(2-fluorphenyl)-1-methyl-4H-imidazo [1,5-a] [1,4] benzodiazepin); Molgewicht 325,77; Bruttoformel  $C_{18}H_{13}ClFN_3$ ; Fp. ca. 160°C (Base);  $pK_a = 6,15 \pm 0,1$  (N in Position 2).

Besonders bemerkenswert ist eine pH-abhängige Ringöffnung: Bei pH-Werten über 4 liegt das Gleichgewicht auf der Seite des geschlossenen Ringes (Struktur I), während bei niedrigeren pH-Werten eine *reversible* Ringöffnung (Struktur II) stattfindet (vgl. Abb.1). Die Löslichkeit beträgt in wäßrigen Lösungen etwa 85 mg/ml bei pH 2,7 bzw. 0,3 mg/ml bei pH 7,6 [5]. Dosierung von Midazolam: 2,5–5 mg i.v. (0,05–0,10 mg/kg KG) 5–10 min vor dem Eingriff.

**1-Hydroxymethyl-midazolam (III)** (=  $\alpha$ -Hydroxi-midazolam) (8-Chlor-6-(2-fluorphenyl)-4H-imidazo [1,5-a], [1,4]-benzodiazepin-1-methanol); Molgewicht 341,7; Bruttoformel  $C_{18}H_{13}ClFN_3O$ .

**4-Hydroxi-midazolam (IV)** (8-Chlor-6-(2-fluorphenyl)-1-methyl-4H-imidazo [1,5-a], [1,4] benzodiazepin-4-ol); Molgewicht 341,77; Bruttoformel  $C_{18}H_{13}ClFN_3O$ .



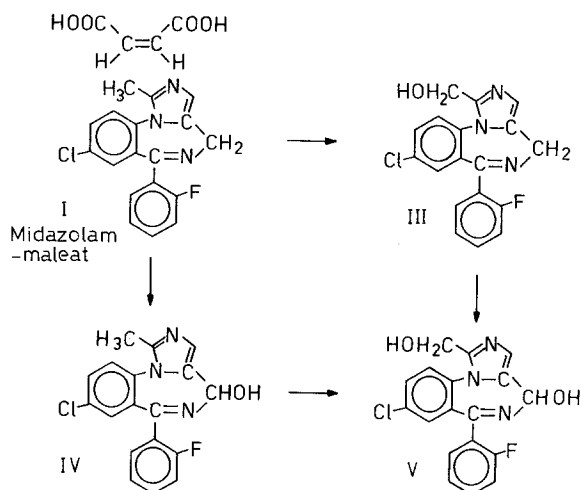
**Abb. 1.** Abhängigkeit der Midazolam-Struktur vom pH-Wert

<sup>1</sup> In der Schweiz ist Midazolam auch in Tablettenform im Handel erhältlich

*1-Hydroxymethyl-4-hydroxi-midazolam* (V) (=  $\alpha$ , 4-Dihydroximidazolam) (8-Chlor-6-(2-fluorphenyl)-4-hydroxi-4H-imidazo [1,5-a] [1,4] benzodiazepin-1-methanol); Molgewicht 357,77; Bruttoformel  $C_{18}H_{13}ClFN_3O_2$ .

### Biotransformation und Pharmakokinetik

In Abb.2 ist ein Biotransformationsschema wiedergegeben. Identifiziert wurden die Metaboliten 1-Hydroxymethyl-midazolam (III) (=  $\alpha$ -Hydroxi-mida-



**Abb.2.** Biotransformation von Midazolam beim Menschen

**Tabelle 1.** Plasmakonzentrationen von Midazolam nach der Verabreichung von Midazolam [9]

Dosis	
10 mg oral	ca. 80 ng/ml nach 0,5 Std (peak level)
	ca. 50 ng/ml nach 1,0 Std
	ca. 25 ng/ml nach 2,0 Std
	ca. 15 ng/ml nach 3,0 Std
20 mg oral	ca. 230 ng/ml nach 0,5 Std (peak level)
	ca. 140 ng/ml nach 1,0 Std
	ca. 90 ng/ml nach 2,0 Std
	ca. 50 ng/ml nach 3,0 Std
0,15 mg/kg i. v.	ca. 290 ng/ml nach wenigen Minuten (peak level)
	ca. 125 ng/ml nach 1,0 Std
	ca. 55 ng/ml nach 2,0 Std
	ca. 35 ng/ml nach 3,0 Std
Harnkonzentrationen an konjugiertem $\alpha$ -OH-Midazolam (III)	
10 mg oral	7– 8 mg innerhalb 24 Std
20 mg oral	13–16 mg innerhalb 24 Std
0,15 mg/kg i. v.	6– 9 mg innerhalb 24 Std

zolam), 4-Hydroxi-midazolam (IV) und 1-Hydroximethyl-4-hydroxi-midazolam (V) (=  $\alpha$ , 4-Dihydroxi-midazolam) [1, 4, 9–12, 19–21]. Die Hydroxiverbindungen III, IV und V liegen fast ausschließlich als Konjugate vor.

Im *Blut* tritt nach therapeutischen Dosen (z.B. 10 mg i.v.) neben Midazolam (I) praktisch nur der Hauptmetabolit 1-Hydroximethyl-midazolam (III) auf, wobei die Plasmakonzentration von *freiem* III meist unter der Nachweisgrenze liegt. Meßbar sind dagegen Maximal-Spiegel von III-Glucuronid in der Größenordnung von 300 ng III-Glucuronid/ml bei einer Eliminationshalbwertszeit von etwa 80 min neben Midazolamkonzentrationen (Peak Level) von etwa 100 ng I/ml nach 30 min bzw. etwa 10 ng I/ml nach ca. 3 Std [21]. Die Elimination erfolgt also außerordentlich rasch. 4-Hydroxi-midazolam (IV) und 1-Hydroximethyl-4-hydroxi-midazolam (V) werden praktisch sofort und quantitativ konjugiert.

Im *Harn* treten allenfalls Spuren von Midazolam (I) auf. Der Hauptweg der renalen Exkretion verläuft über III zu III-Glucuronid. Es wird ein hoher „first pass-Effekt“ angenommen [2, 10, 21]. Der Anteil von III-Konjugat beträgt innerhalb 24 Std 60–70% der verabreichten Dosis [10]. Die Proteinbindung von I liegt bei etwa 96% [7].

## Untersuchungen zur Analytik

### Extraktion

Zur Isolierung der freien Wirkstoffe werden *Serumproben* (z.B. 1–2 ml) mit der gleichen Menge gesättigter Natriumphosphatlösung ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , aqu.) versetzt und mit Diethylether gründlich extrahiert (Vortex-Mixer). Die organische Phase wird abgesaugt und eingedampft (nach Möglichkeit im Stickstoffstrom). Die Aufbewahrung erfolgt tiefgekühlt ( $-20^\circ\text{C}$ ). Kurz vor der Weiteruntersuchung wird in 0,1 ml Methanol gelöst.

*Harnproben* werden nach Zugabe von Natronlauge bis pH 11–12 ebenfalls mit Diethylether extrahiert. Weitere Verarbeitung s. o.

Zur *Konjugatspaltung* werden die Proben in der gewohnten Weise mit Aryl-Sulfatase (EC 3.1.6.2)/ $\beta$ -Glukuronidase (EC 3.2.1.31) (z.B. Art.-Nr. 15427 EGAF Boehringer, Mannheim) versetzt (ca. 0,5 Vol.%) und 18–24 Std bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Extraktion der aus den Konjugaten freigesetzten Metaboliten erfolgt anschließend in der oben geschilderten Weise.

### Dünnschichtchromatographie (TLC, DC)

Eine hydrolytische Spaltung zu Aminobenzophenon-Derivaten ist bei Midazolam und seinen Metaboliten zwar möglich (vgl. Abb. 1); dabei entstehen jedoch keine Verbindungen, die im Rahmen der bestehenden Screening-Tests [14–18] nach Bratton und Marshall (über Diazotierung und Azokupplung) anzufärben sind.

Zum Screening wird daher die dünnschichtchromatographische Untersuchung der unveränderten Wirkstoffe empfohlen, wobei jedoch zu beachten

ist, daß die Elimination aus dem Organismus außerordentlich rasch erfolgt (vgl. pharmakokinetische Daten). Es wurden folgende  $hR_f$ -Werte gemessen:

**Tabelle 2.**  $hR_f$ -Werte

Substanz	Fließmittelsystem						
	Toluol	85	Chloroform	80	Methanol	Ethylacetat	85
	iso-Propanol	15	Ethanol	20		Methanol	10
	Ammoniak 25% (v/v)	5	(v/v)			Ammoniak 25% (v/v)	5
Midazolam (I)	45		82		71		61
$\alpha$ -OH-midazolam (III)	34		76		76		49
4-OH-midazolam (IV)	23		71		73		53
$\alpha$ ,4-Dihydroxi-midazolam (V)	17		56		78		38

Technische Einzelheiten: DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub>,  
20 × 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm (z. B. Art.-Nr. 5715 E. Merck);  
Detektion: a) Fluoreszenzminderung bei 254 nm  
b) Reagenz nach Dragendorff (orangebraune Anfärbung bei I, III und IV)  
c) Kaliumiodoplatinat (orangebraune Anfärbung bei IV)  
Aufsteigende Methode, Kamersättigung, keine besondere Aktivierung

**Tabelle 3.** Unsere Untersuchungen ergaben folgende Retentionsindizes nach Kováts

Substanz	OV-101			OV-17		
	220°C	250°C	280°C	220°C	250°C	280°C
Midazolam	2570	2620	2680	3080	3155	3210
$\alpha$ -Hydroxi-midazolam	2725	2780	2825	—	3355	3415
4-Hydroxi-midazolam (wahrscheinlich Pyrolyseprodukt)	2485	2535	2580	3005	3070	3115

*Gaschromatographie (GLC, GC)*

Bedingt durch den polaren Charakter von Midazolam und insbesondere seiner Metaboliten tritt die Gaschromatographie bezüglich ihrer Brauchbarkeit etwas in den Hintergrund. So ist es unumgänglich, die hydroxilierten Metaboliten III, IV und V mittels BSTFA zu silylieren. Eine diesbezügliche Arbeitsvorschrift wurde von Puglisi et al. [13] publiziert (Nachweisgrenze 5 ng/ml für Midazolam). Greenblatt et al. [6] entwickelten eine weitere GLC-Methode (Silylierung mit BSTFA, 5% OV-101 auf Gaschrom Q, ECD). Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 4 ng/ml (Midazolam) bzw. 3 ng/ml ( $\alpha$ -Hydroxi-midazolam (III)). Zur gaschromatographischen Bestimmung von Midazolam und (III) siehe auch [8].

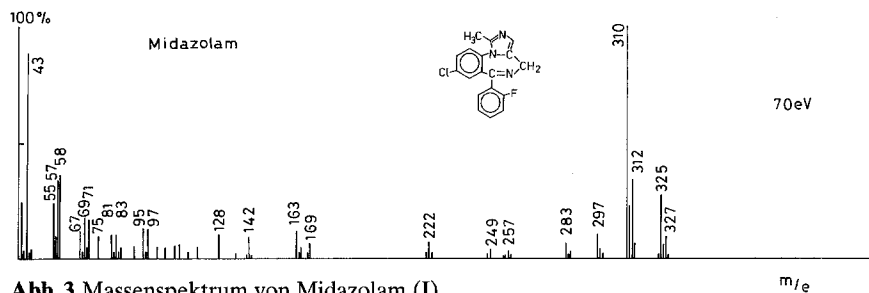


Abb.3. Massenspektrum von Midazolam (I)

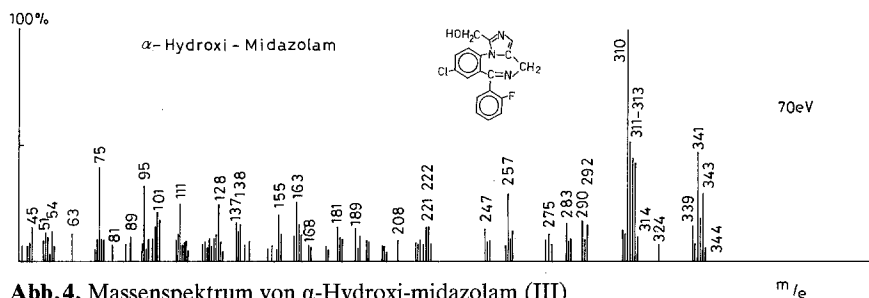
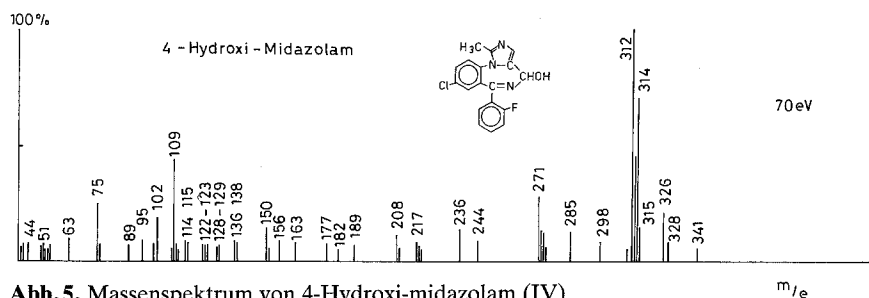
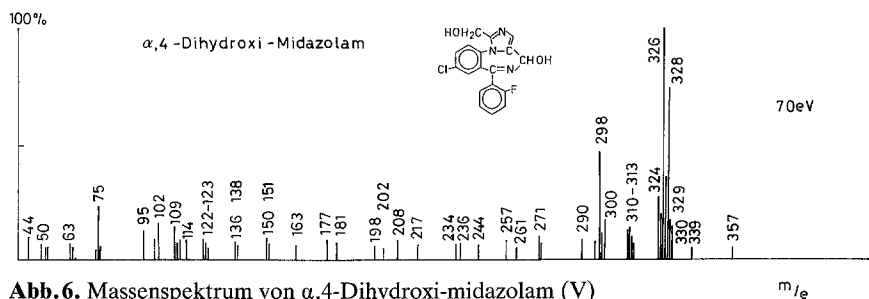
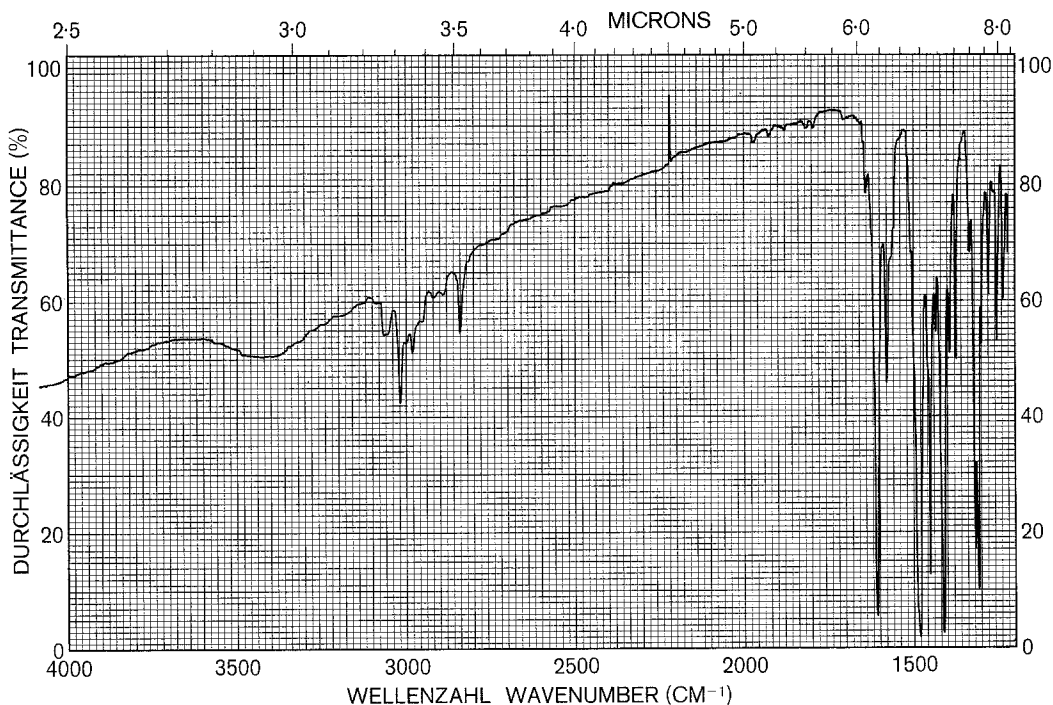
Abb.4. Massenspektrum von  $\alpha$ -Hydroxi-midazolam (III)

Abb.5. Massenspektrum von 4-Hydroxi-midazolam (IV)

Abb.6. Massenspektrum von  $\alpha$ ,4-Dihydroxi-midazolam (V)

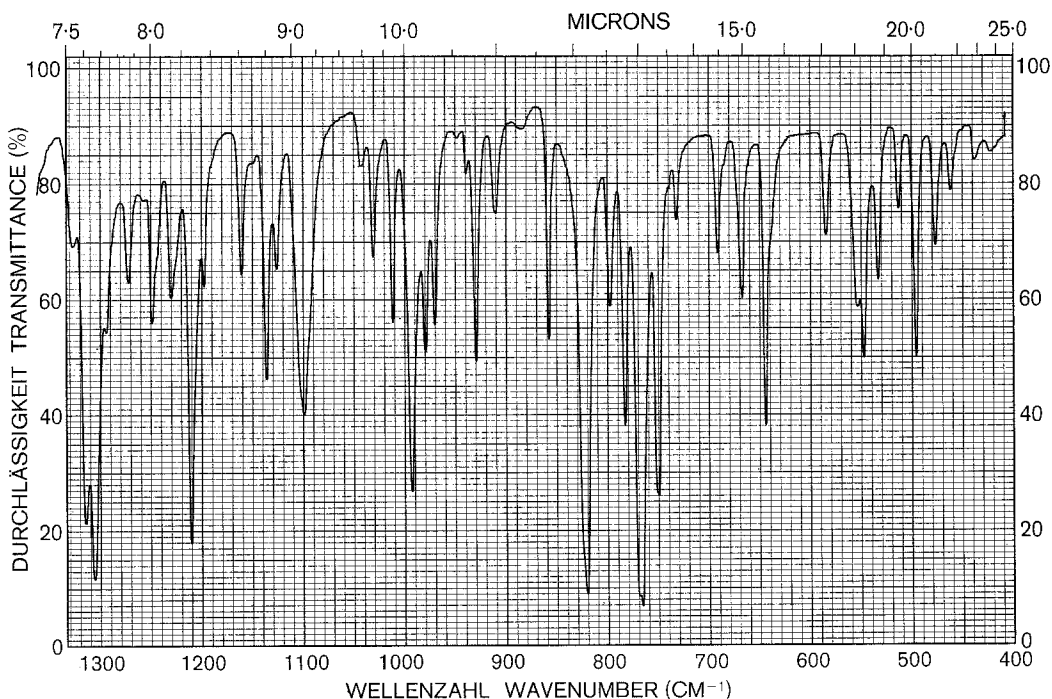
### Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, LC)

Diese Methode eignet sich gut für die Analytik von Midazolam und seinen Metaboliten. Besonders erwähnenswert ist der große Linearitätsbereich von 30 ng bis 10  $\mu$ g. Weitere Daten: LiChrosorb RP 8, 5  $\mu$ m, Detektion bei 215 nm, Nachweisgrenze 30 ng/ml, Mobile Phase 0,02 mol/l Natriumazetat/Methanol (600:400, v/v), 1,6 ml/min, 22,78 MPa. Nähere Einzelheiten s. Vree et al. [21].



PROBE SAMPLE <b>Midazolam - Base</b>	KURVE NR. CURVE NO.	GESCHWINDIGKEIT SCAN SPEED <b>slow</b>	BEARBEITER OPERATOR
HERKUNFT ORIGIN	KONZENTRATION CONC.	SPALT SLIT <b>N</b>	DATUM DATE
LOSUNGSMITTEL SOLVENT <b>KBr</b>	SCHICHTDICKE CELL PATH	BEMERKUNGEN REMARKS	
VERGLEICH REFERENCE			

Brunberg & Co. 4532 Linsdorf W. Germany Hoffmann-Bergschneiderei Holland A. Collet 17 Rue-Camille-Robert France für Nr. 337-1503



PROBE SAMPLE <b>Midazolam - Base</b>	KURVE NR. CURVE NO.	GESCHWINDIGKEIT SCAN SPEED <b>slow</b>	BEARBEITER OPERATOR
HERKUNFT ORIGIN	KONZENTRATION CONC.	SPALT SLIT <b>N</b>	DATUM DATE
LOSUNGSMITTEL SOLVENT <b>KBr</b>	SCHICHTDICKE CELL PATH	BEMERKUNGEN REMARKS	
VERGLEICH REFERENCE			

Brunberg & Co. 4532 Linsdorf W. Germany Hoffmann-Bergschneiderei Holland Controflex Graphique S.A. 17 Rue-Camille-Robert France für Nr. 337-1504

**Abb. 7a, b.** Infrarotspektrum von Midazolam-Base

### *Massenspektrometrie (MS)*

Die Massenspektren von I, III, IV und V sind in den Abbildungen 3–6 wiedergegeben. Technische Daten: Direkteinlaß, E.I. 70 eV, 80°C (I), 150°C (III), 125°C (IV) bzw. 160°C (V).

### *Ultraviolet-Spektroskopie (UV)*

Die UV-Spektren von Midazolam und seinen Metaboliten sind wenig charakteristisch und besitzen lediglich Maxima im Bereich der Absorptionsgrenze. Sie kommen daher kaum für einen Screening oder Nachweis in Betracht.

### *Infrarot-Spektroskopie (IR)*

Im Hinblick auf den relativ hohen Substanzbedarf der Methode (auch bei Anwendung von Mikrotechniken) und die nach der Einnahme von Midazolam nur sehr geringen Wirkstoffkonzentrationen, ist der Einsatz der IR-Spektroskopie praktisch auf die Untersuchung und Identifizierung von Handelszubereitungen (z.B. Ampulleninhalt) begrenzt. Das Infrarot-Spektrum von Midazolam ist in Abb.7 wiedergegeben (Midazolam-Base).

### *Enzymimmunoassay (EMIT<sup>R</sup>)*

Beim EMIT(d.a.u.)-Test bewirken 0,3 mg Midazolam/l die gleiche Extinktionsänderung wie 0,5 mg Oxazepam/l oder 0,4 mg Diazepam/l. Mit diesem gut praktikablen Verfahren steht somit ebenfalls eine rasche und empfindliche Screening-Methode zur Verfügung.

## **Diskussion**

Aufgrund der Untersuchungen können je nach Fragestellung folgende Analysemethoden empfohlen werden:

### *Screening*

EMIT<sup>R</sup>-Verfahren; Dünnschichtchromatographie beim Vorliegen günstiger Ausscheidungsverhältnisse; Massenspektrometrie in der S.I.M.-Variante (empfohlener Wert  $m/e = 310$  für Midazolam and  $\alpha$ -Hydroxi-midazolam).

### *Identifizierung*

Massenspektrometrie, chromatographische Verfahren (Kombination, insbesondere HPLC), bei der Untersuchung von Zubereitungsformen auch IR-Spektroskopie.

*Danksagung.* Wir danken der Fa. Hoffmann – La Roche A.G. für die freundliche Überlassung von Substanz- und Schriftenmaterial.

Herrn PD Dr. D. Post danke ich für die Messung der Retentionsdaten.



Für eine ständige Förderung und Unterstützung sei nicht zuletzt auch folgenden Institutionen gedankt: Bund gegen Alkohol im Straßenverkehr e.V.; Deutsche Forschungsgemeinschaft; Fonds der Chemischen Industrie.

## Literatur

1. Amrein R, Cano JP, Eckert M, Coassolo P (1981) Pharmakokinetik von Midazolam nach intravenöser Verabreichung. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 31:2202–2205
2. Amrein R, Leishman B, Nicholson AN (Editors) (1983) Proceedings of the first international sleep symposium on midazolam. *Br J Clin Pharmacol* 16:1–199
3. Beck H, Sand M, Kuhlmann J (1984) Arzneimittelmärkte aktuell (Dormicum® Roche). *Dtsch Apoth-Ztg* 124:1470
4. Editio Cantor KG (Aulendorf) (1981) Sonderheft Nr 12a. „Midazolam“ der *Arzneim-Forsch/Drug Res*
5. Gerecke M (1983) Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. *Br J Clin Pharmacol* 16:11–16
6. Greenblatt DJ, Locniskar A, Ochs HR, Lauven PM (1981) Automated gas chromatography for studies of midazolam pharmacokinetics. *Anesthesiology* 55:176–179
7. Heinzl S (1984) Neue Arzneimittel 4/5 (Dormicum® Roche). Beilage der Deutschen Apotheker Zeitung
8. Heizmann P, von Alten R (1981) Determination of midazolam and its  $\alpha$ -hydroxymethyl metabolite in plasma by gas chromatography with electron capture detector. *J High Res Chromatogr* 6:266–269
9. Heizmann P, Eckert M, Ziegler WH (1983) Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. *Br J Clin Pharmacol* 16:43–49
10. Heizmann P, Ziegler WH (1981) Excretion and metabolism of  $^{14}\text{C}$ -midazolam in humans following oral dosing. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 31:2220–2223
11. Kanto J, Sjövall S, Erkkola R, Himberg JJ, Kangas L (1983) Placental transfer and maternal midazolam kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 33:786–791
12. Pieri L, Schaffner R, Scherschlicht R et al. (1981) Pharmacology of midazolam. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 31:2180–2201
13. Puglisi CV, Meyer JC, D'Arconte L, Brooks A, de Silva JAF (1978) Determination of water soluble imidazo-1,4-benzodiazepines in blood by electron-capture gas-liquid-chromatography and in urine by differential pulse polarography. *J Chromatogr* 145:81–96
14. Schütz H (1978) TLC-Data of 19 main hydrolysis derivatives of 1,4- and 1,5-benzodiazepines and major metabolites. *J Anal Toxicol* 2:147–148
15. Schütz H (1981) Analytik und Biotransformation von Triazolam (Halcion®), einem neuen Benzodiazepin mit forensisch relevanten Nebenwirkungen. *Beitr Gerichtl Med* 39:339–346
16. Schütz H (1982a) *Benzodiazepines – A Handbook*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
17. Schütz H (1982b) Screening von Benzodiazepinen. *Ärztl Lab* 28:47–57
18. Schütz H, Westenberger V (1979) Gas-chromatographic data of 31 benzodiazepines and metabolites. *J Chromatogr* 169:409–411
19. Sjövall S (1983) The use of midazolam as a premedicant and an intravenous anaesthetic agent – a clinical and pharmacokinetic study. Academic Dissertation, Turku
20. Smith MT, Eadie MJ, O'Rourke Brophy T (1981) The pharmacokinetics of midazolam in man. *Eur J Clin Pharmacol* 19:271–278
21. Vree TB, Baars AM, Booij LDH, Driessen JJ (1981) Simultaneous determination and pharmacokinetics of midazolam and its hydroxymetabolites in plasma and urine of man and dog by means of high-performance liquid chromatography. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 31:2215–2219