Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 528—530

Zur Unterscheidung der Benzodiazepine Lorazepam¹⁾ und Oxazepam²⁾ mit Hilfe der dünnschichtchromatographischen Trennung-Reaktion-Trennung-Technik

Von CLAUDIA SCHÜTZ und H. SCHÜTZ

*Aus dem Institut für Rechtsmedizin (mit der komm. Leitung beauftragt: Prof. Dr. Dr. G. Schewe)
der Universität Gießen*

(Eingegangen am 2. Mai/27. Juni 1972)

Es wird ein Verfahren zur Trennung von Lorazepam¹⁾ und Oxazepam²⁾ mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Untersuchung der auf der Platte gebildeten Hydrolyseprodukte mitgeteilt.

The separation of the benzodiazepines Lorazepam¹⁾ and Oxazepam²⁾ by thin-layer chromatographic separation-reaction-separation-technique

A method is described for the separation of Lorazepam¹⁾ and Oxazepam²⁾ by the thin-layer-chromatographic investigation of their hydrolysis products which are formed on the plate.

In ihrer Arbeit zur Biotransformation von 7-Chlor-5-(*o*-chlorphenyl)-1,3-dihydro-3-hydroxy-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (Lorazepam) beschrieben SCHILLINGS, SHRADER und RUELIS (1) die dünnschichtchromatographische Trennung dieses neuen Tranquilizers aus der Reihe der Benzodiazepine von seinen Metaboliten. Hierzu eignen sich nach den Angaben der genannten Autoren die Fließmittelsysteme Chloroform/Äthanol/Aceton (8:1:1 v/v) sowie Essigsäureäthylester/Äthanol/konz. Ammoniak (5:5:1 v/v). Mit Kieselgel als Trägermaterial ergaben sich für Lorazepam die R_F -Werte 0,35 bzw. 0,63.

Bei der Diskussion ihrer Ergebnisse verweisen SCHILLINGS et al. auf die engen strukturellen Beziehungen zwischen Lorazepam und Oxazepam, die sich auch in einem weitgehend analogen Stoffwechselschema ausdrücken. Beide Benzodiazepinderivate sind bereits hydroxyliert und können somit ohne weitere Metabolisierungsschritte im Organismus mit Glucuronsäure gepaart und in dieser Form renal ausgeschieden werden.

Aufgrund des ähnlichen Baues dieser Verbindungen (Oxazepam enthält lediglich ein Chloratom weniger) vermuteten wir Schwierigkeiten bei der dünnschichtchromatographischen Trennung, da für das Sorptionsverhalten hauptsächlich die polare Hydroxylgruppe bestimmend ist.

Die nachstehend aufgeführte Tabelle 1 informiert über die wichtigsten Ergebnisse unserer Trennversuche:

Tab. 1

Versuche zur dünnschichtchromatographischen Trennung von Lorazepam und Oxazepam. (Trägermaterial: selbstgefertigte Kieselgel GF₂₅₄-Platten, Schichtdicke 0,5 mm, Aktivierung: 30 min bei 110°C, danach Aufbewahrung über Silikagel, aufsteigende Methode mit Kamersättigung.)

Fließmittelsystem	R_F -Werte	
	Lorazepam	Oxazepam
Äthanol/Essigsäure-äthylester/Essigsäure (50 ml + 50 ml + 2 ml)	0,72	0,72
Benzol/Dioxan/Aceton/Ammoniak (25proz.) (50 ml + 20 ml + 28 ml + 2 ml)	0,37	0,37
Chloroform/Aceton (90 ml + 10 ml)	0,10	0,10
Chloroform/Äthanol (90 ml + 10 ml)	0,38	0,38
Chloroform/Aceton/Äthanol (80 ml + 10 ml + 10 ml)	0,58	0,58
Essigsäureäthylester/Dimethylformamid (75 ml + 25 ml)	0,95	0,93
Essigsäureäthylester/ <i>n</i> -Heptan/Äthanol/Ammoniak (25proz.) (70 ml + 70 ml + 10 ml + 5 ml)	0,67	0,67
Methanol/Methylamin (99,7 ml + 0,3 ml)	0,69	0,69

An dieser Stelle sei vermerkt, daß die Trennung von anderen gebräuchlichen Benzodiazepinderivaten wie Chlorazepate (Tranxilium³⁾), Chlordiazepoxid (Librium⁴⁾), Diazepam (Valium⁵⁾), Medazepam (Nobrium⁶⁾)

¹⁾ 7-Chlor-5-(*o*-chlorphenyl)-1,3-dihydro-3-hydroxy-2H-1,4-benzodiazepin-2-on.

²⁾ 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on.

³⁾ 7-Chlor-3-carboxy-1,3-dihydro-2,2-dihydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin.

⁴⁾ 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxid.

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

⁶⁾ 7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin.

und Nitrazepam (Mogadan)⁷⁾ schon mit relativ einfach zusammengesetzten Fließmittelsystemen möglich ist. Um zu einer Unterscheidungsmöglichkeit zu gelangen, wandten wir bei unseren weiteren Untersuchungen die Trennung-Reaktion-Trennung-Technik an, eine Methode, die von STAHL (2, 3) beschrieben wurde und die uns schon wiederholt bei dünnenschichtchromatographischen Trennproblemen bessere Ergebnisse als die vorwiegend gebräuchlichen zweidimensionalen Verfahren brachte (4, 5, 6).

Zur Derivatbildung hydrolysieren wir die in der ersten Laufrichtung von Begleitstoffen getrennten Benzodiazepine durch Erhitzen mit Salzsäure auf der Platte. Anschließend werden die nach dem folgenden Schema entstandenen Benzophenonderivate in der zweiten Dimension entwickelt:

Da die R_F -Wert-bestimmende Hydroxylgruppe bei der sauren Hydrolyse mit einem Teil des ursprünglich vorhandenen Benzodiazepins abgetrennt wird, ist eine Charakterisierung der verschiedenen substituierten Benzophenone nunmehr schon mit einem relativ einfachen Fließmittel leicht möglich. Die beigefügte Abbildung eines Chromatogrammes soll diesen Sachverhalt und die nachstehend mitgeteilte Methodik veranschaulichen (s. Abb. 1).

Methodik

Reagenzien und Arbeitsmaterial

Äthanol	Kaliumjodid
Ammoniak, 25proz.	N-(1-Naphthyl)äthylendiamin
Benzol	Natriumnitrit
Diäthyläther	Salzsäure 37proz.
Dimethylformamid	Wismutnitrat, basisch (alle Chemikalien in analysenreiner Qualität)
Essigsäure 99–100%	
Essigsäureäthylester	
n-Heptan	

β -Glucuronidase (β -D-Glucuronide glucuronohydrolase, EC 3.2.1.31) (Bezugsquellen: E. Merck AG, Darmstadt, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg).

Trägermaterial: DC-Fertigplatten Kieselgel F 254 schnellaufend, (Kieselgel/Kieselgur) Schichtdicke 0,25 mm (Art. 5737/0025 Merck)

⁷⁾ 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on.

Abb. 1

Dünnenschichtchromatographische Unterscheidung von Lorazepam und Oxazepam mit Hilfe der Trennung-Reaktion-Trennung-Technik

Träger: DC-Fertigplatten Kieselgel F 254
schnellaufend (Kieselgel/Kieselgur), Schichtdicke 0,25 mm (Art. 5737/0025 Merck)

Aktivität: ohne besondere Aktivierung
Fließmittel I: n-Heptan/Essigsäureäthylester/Äthanol/Ammoniak 25proz. (70 ml + 70 ml + 10 ml + 5 ml)

Fließmittel II: Benzol

Aufsteigende Methode mit Kammersättigung

Erläuterungen zur Aufteilung des Chromatogrammes:

- A = Vergleichsfeld für die erste Laufrichtung, keine Hydrolyse;
- B = Probenfeld, zweidimensional;
- C = Vergleichsfeld für die zweite Laufrichtung, Hydrolyse am Start;
- x = Startpunkt der ersten Dimension;
- o = Startpunkt der zweiten Dimension

Der schraffiert gezeichnete Streifen des Chromatogramms wird zur Hydrolyse mit Salzsäure behandelt

Flecke:

- 1 = Oxazepam
- 2 = Lorazepam
- 3 = 2-Amino-2',5-dichlor-benzophenon aus Lorazepam
- 4 = 2-Amino-5-chlor-benzophenon aus Oxazepam
- 5 = 2-Amino-5-chlor-benzophenon
- 6 = 2-Amino-2',5-dichlor-benzophenon

Detektion:

Feld A: DRAGENDORFF-Reagenz (s. Methodik)
Felder B und C: BRATTON-MARSHALL-Reagenz (s. Methodik)

Auftragkapillaren bzw. Mikropipetten

Reinsubstanzen der Benzodiazepine und Benzophenonderivate zu Vergleichszwecken

Sprühvorrichtung (Spray-Gun)

Trockenschrank (100°C)

Chromatographiekammern

Ablüftvorrichtung (Heizlüfter mit Kaltstufe)

Fließmittel I: n-Heptan/Essigsäureäthylester/Äthanol/Ammoniak 25proz (70 ml + 70 ml + 10 ml + 5 ml)

Fließmittel II: Benzol.

BRATTON-MARSHALL-Reagenz: 1,0 g N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin wird in 50 ml Dimethylformamid und 50 ml Salzsäure (4 mol/l) eventuell unter Erwärmen gelöst. Die kalte Lösung wird filtriert, falls sie nicht völlig klar ist (7, 8).

DRAGENDORFF-Reagenz (nach MUNIER und MACHEBOEUF) (2): Lösung a: 0,85 g basisches Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.

Lösung b: 8 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst.

Vorratslösung: Gleiche Volumina der Lösungen a und b werden gemischt (in dunkler Flasche gut haltbar).

Sprühlösung: Vor Gebrauch werden 1 ml Vorratslösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser gemischt.

Durchführung

Das zu untersuchende Material (Tablettenauszug, Urinextrakt nach vorheriger enzymatischer Hydrolyse mit β -Glucuronidase⁸⁾) wird auf dem Hauptfeld eines zweidimensionalen Dünnschichtchromatogrammes am Startpunkt aufgetragen. Vermutete Benzodiazepine sowie Benzophenonderivate führt man als Referenzsubstanzen auf den beiden Seitenfeldern mit⁹⁾. Die Platte wird nun in der ersten Dimension mit einem geeigneten Fließmittel (z. B. *n*-Heptan/Essigsäureäthylester/Äthanol/Ammoniak 25proz. (70 ml + 70 ml + 10 ml + 5 ml)) entwickelt und anschließend im Kaltluftstrom eines Gebläses gründlich abgelüftet. Man deckt das Chromatogramm mit zwei Glasplatten so zu, daß lediglich der in der Abbildung markierte Kieselgelstreifen frei bleibt und sprüht diesen Sektor unter dem Abzug mit 37proz. Salzsäure gleichmäßig aber nicht bis zur Nässe ein. Nachdem die so behandelte Platte mit einem Glas gleicher Größe vollständig bedeckt wurde, erhitzt man im Trockenschrank etwa 10 min auf 100–110°C. Danach entfernt man die Deckplatte und beläßt das Chromatogramm nochmals 5 min bei der angegebenen Temperatur. Die herausgenommene Platte wird abgekühlt und in einer geschlossenen Kammer etwa 3 min mit Ammoniakdämpfen begast (Becherglas mit etwa 10 ml 25proz. Ammoniaklösung auf dem Boden der Kammer), um die entstandenen Benzophenone aus der Salzform in die freie Base zu überführen. Nach kurzem Ablüften erfolgt die Entwicklung in der zweiten Dimension mit Benzol. Anschließend wird das Chromatogramm gut getrocknet und in eine weitere Kammer gestellt, die nitrose Gase enthält (Becherglas mit wäßriger Natriumnitritlösung in der Kammer, mit einer Pipette etwas konzentrierte Salzsäure bis zur Gasentwicklung zugeben). Hierbei erfolgt während einer Verweildauer von etwa 3–5 min die Diazotierung der primären aromatischen Aminogruppen. Nach dem Herausnehmen der Dünnschichtplatte läßt man die anhaftenden nitrosen Gase unter dem Abzug vollständig abdampfen (Geruchsprobe; etwa 30–45 min). Beim Kuppeln mit BRATTON-MARSHALL-Reagenz (Besprühen mit der angegebenen Lösung) erkennt man die Benzophenonderivate als

⁸⁾ Die Urinprobe wird bei pH 5,4 mit 3000 FISHMAN-Einheiten β -Glucuronidase pro ml Harn versetzt und etwa 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird bei pH 7 4mal mit 20 ml Diäthyläther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte werden im Rotationsverdampfer eingeengt.

⁹⁾ Es wurden jeweils 10 μ l einer Lösung des betreffenden Benzodiazepins bzw. Benzophenonderivates mit der Konzentration 1 mmol/l Methanol aufgetragen.

violette Farbflecke. Die Nachweisgrenze wurde zu 0,01 μ g ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Die angegebene Methode erlaubt es, Lorazepam und Oxazepam sicher zu unterscheiden. Mit Hilfe der zweidimensionalen Technik und einer sauren Hydrolyse auf der Dünnschichtplatte ist es möglich, die entstandenen Benzophenonderivate aufgrund ihres R_F -Wertes in der ersten Laufrichtung dem jeweiligen Benzodiazepin zuzuordnen. Die Anwendung einer weit verbreiteten Methodik (9–19), bei der die zur Untersuchung gelangenden Proben in einem geeigneten Gefäß sauer hydrolysiert und die anschließend mit organischen Lösungsmitteln extrahierten Benzophenone chromatographiert werden, läßt eine solche spezifische Aussage nicht zu, da auch bei der Spaltung anderer Benzodiazepine (z. B. Chlordiazepoxid und Chlorazepate) 2-Amino-5-chlor-benzophenon entsteht. Die von den beiden letztgenannten Verbindungen durch Hydrolyse gewonnenen 2-Amino-5-chlor-benzophenon-Anteile erscheinen bei der mitgeteilten Verfahrensweise an anderen Stellen des Chromatogrammes, da sich die unveränderten Benzodiazepine schon in der ersten Laufrichtung gut trennen lassen. Dennoch dürfte die einfachere Technik der Hydrolyse ohne Vortrennung dann angebracht sein, wenn bei einer Kontrolluntersuchung Benzodiazepine entweder ausgeschlossen oder als ganze Wirkstoffgruppe ohne Berücksichtigung eines Einzelvertreters nachgewiesen werden sollen.

Anerkennungen

Wir danken der Firma Wyeth-Pharma GmbH (Münster/Westf.) für die freundliche Überlassung von Substanzproben. Unser besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Dr. Post (Institut für Rechtsmedizin der Universität Gießen), sowie Herrn FRITSCH (Firma Hoffmann-La Roche, AG, Grenzach) für eine umfassende Unterstützung unserer analytischen Arbeiten.

Literatur

- SCHILLINGS, R. T., SHRADER, S. R. & RUELIUS, H. W. (1971), *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 21, 1059–1065.
- STAHL, E. (1967), *Dünnschichtchromatographie*, 2. Aufl., S. 88, 370, 378, 616, 617, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- STAHL, E. (1960), *Arch. Pharm.* 293, 531.
- SCHÜTZ, C. & SCHÜTZ, H. (1972), *Arch. Toxikol.* 28, 286–295.
- SCHÜTZ, C. & SCHÜTZ, H. (1972), *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* im Druck.
- SCHÜTZ, C. & SCHÜTZ, H. (1972), *Fresenius' Z. Anal. Chem.* Manuskript eingereicht.
- BRATTON, A. C. & MARSHALL, E. K. (1939), *J. Biol. Chem.* 128, 537–550.
- THOMA, F. (1966), *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 16, 771–773.
- BÄUMLER, J. & RIPPSTEIN, S. (1961), *Helv. Chim. Acta* 44, 2208–2210.
- BESSERER, K., HENZLER, S., KOHLER, E. & MALLACH, H. J. (1971), *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 21, 2003 bis 2006.
- BEYER, K. H. (1971), *Index der Psychopharmaka (Roche)* 195–225.
- BOHN, G. & CLASING, D. (1972), *Sportarzt und Sportmed.*, im Druck.
- GELDMACHER-V. MALLINCKRODT, M. & MANG, U. (1970), *diese Z.* 8, 259–262.
- KAMM, G. & BAIER, R. (1969), *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 19, 213–215.
- KAMM, G. & KELM, R. (1969), *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 19, 1659–1662.
- PRIBILLA, O. (1964), *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 14, 723–733.
- PRIBILLA, O. (1965), *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 15, 1148–1152.
- RIEDER, J. (1965), *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 15, 1134–1148.
- SAWADA, H. & SHINOHARA, K. (1970), *Arch. Toxikol.* 27, 71–78.

H. Schütz
Institut für Rechtsmedizin der Universität
6300 Gießen
Frankfurter Straße 58