

## CLONAZEPAM – A DRUG USED FOR MEDICAL AND CRIMINAL PURPOSES

Ewa JANOWSKA, Piotr ADAMOWICZ, Ewa CHUDZIKIEWICZ, Wojciech LECHOWICZ

*Institute of Forensic Research, Krakow, Poland*

### Abstract

Clonazepam is a benzodiazepine exhibiting anticonvulsive activity. It is used in epilepsy treatment. In the practice of the Institute of Forensic Research in Krakow, 57 cases involving clonazepam in biological material were recorded from 2003 to 2006. The highest number of cases (29) associated with its administration were noted in 2006. According to the Drug Addiction Counteraction Act of July 29, 2005, clonazepam is classified as being in group IV-P on the list of psychotropic substances. Analysis of the studied cases allows us to infer that this drug is used not only for medical purposes, but also by persons addicted to narcotic drugs and psychotropic substances in order to increase the effects of these drugs on the organism. Simultaneous consumption of clonazepam and ethyl alcohol induces interactions, thus increasing the toxic effects of these substances. This phenomenon is made use of for criminal purposes. Performed analyses show that clonazepam was the most frequently detected benzodiazepine derivative in blood during the last 4 years.

### Key words

Clonazepam; Medicine; Psychotropic substance.

*Received: 2 December 2007; accepted 9 December 2007*

### 1. Introduction

Clonazepam (5-(2-chlorophenyl)-1,3-dihydro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one) is a benzodiazepine derivative (Figure 1). It exhibits basic features that are characteristic of most drugs from this group. However, it stands out as having stronger anticonvulsive action.

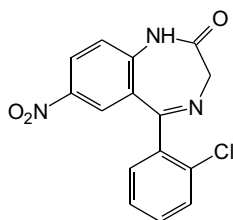


Fig. 1. Chemical structure of clonazepam.

Besides reduction of activity of epileptic discharge, it prevents generalisation of the attacks. It causes loss of muscular tension, which is typical for benzodiazepines. It acts on structures of the cen-

tral nervous system (CNS), mainly on the limbic system and the hypothalamus (facilitating GABAergic transmission). The drug is well absorbed from the digestive tract. The total time of its action is about 24 hours. Central action is observed quickly, but because the medicine transfers to the peripheral tissues, this action is relatively short. Clonazepam is used mainly in myoclonic attacks and in epilepsy [2, 4]. It is an ingredient of such antiepileptic drugs as Anteplepsin, Clonazepamum, Rivotril and Clonopin. Clonazepam is metabolised in the body into 7-aminoclonazepam, and then into 7-acetamidoclonazepam (Figure 2). This drug may cause side effects like drowsiness, feeling of weakness, dizziness, or ataxia. Stimulation, irritability, aggressive behaviours, concentration impairment, reaction slow-down, anterograde amnesia have also been observed after administration of clonazepam [2,

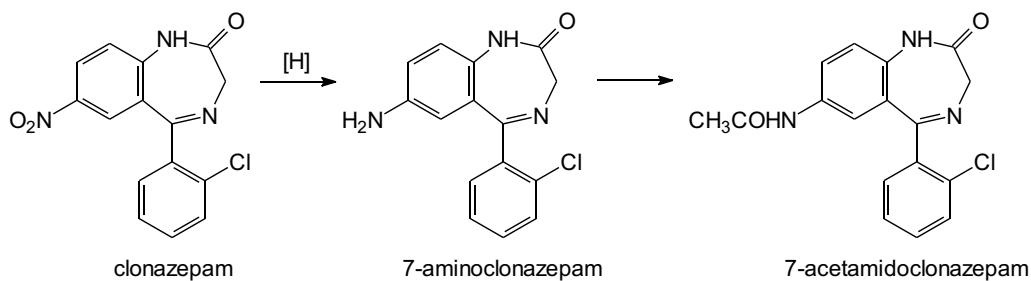


Fig. 2. Metabolic pathway of clonazepam.

4]. It can be taken orally by an adult at a daily dose of 4–10 mg (in 3–4 divided doses). In an epileptic state, it can be administered intramuscularly or intravenously at a dose of 1 mg [2]. The therapeutic blood concentration of clonazepam ranges from 4 to 80 ng/ml, whereas the toxic concentration is higher than 100 ng/ml [3, 5]. According to the Drug Addiction Counteraction Act of July 29, 2005, clonazepam is classified as being in group IV-P on the list of psychotropic substances<sup>1</sup>. According to the Decree of the Ministry of Health of June 11, 2003, benzodiazepine derivatives are considered as agents acting similarly to alcohol and they may not be taken by persons driving vehicles<sup>2</sup>.

## 2. Aim of the study

A four-year (2003–2006) retrospective study, which summarizes routine examinations of blood samples for the presence of narcotic drugs, psychoactive substances and medicines, is presented in this paper.

## 3. Material and methods

### 3.1. Material

The studied material was samples taken from drivers and addicted persons, who were subjected to screening analysis for the presence of drugs of abuse: opium alkaloid derivatives, cocaine, amphetamines (including MDMA), cannabinoids and drugs from the group of benzodiazepine derivatives in the Section for Toxicological Analyses, Department of Forensic Toxicology, Institute of Forensic Research, Krakow.

### 3.2. Chemicals

“Benzodiazepines Group (Oxazepam/Clonazepam)” test kit manufactured by Neogen (United States) was used for determination of benzodiazepines by means of the ELISA method.

Clonazepam, 7-aminoclonazepam and prazepam (internal standard – IS) were purchased from Cerillant (Poland), while acetonitrile and distilled water (HPLC grade) from Merck (Germany). Diisopropyl ether was bought from Fluka (France).

### 3.3. Screening – enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

In the ELISA method, 10  $\mu$ l of blood sample or positive control (blood spiked with 10 ng/ml of clonazepam) diluted 1:4 in a buffer delivered by the manufacturer were placed into the “well” of a microplate coated with anti-drug antiserum, followed by addition of analyte-enzyme conjugate. After incubation at room temperature for 45 min, the liquid was removed from the wells and the microplate was washed three times with the buffer. Then, substrate was added to the dried wells. After a 30 min incubation, the reaction was halted. Measurement of the absorbance of the obtained solution was performed within a 2-hour period after stopping the reaction.

Each positive result obtained by the screening method was confirmed by a specific method.

### 3.4. Confirmatory method – liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS)

#### 3.4.1. Liquid-liquid extraction

Prazepam (IS) was added to 0.2 ml of blood to achieve a concentration of 1000 ng/ml, followed by addition of 0.2 ml of phosphate buffer at pH 7.4. Then, the solution was subjected to extraction by 1 ml of diisopropyl ether.

<sup>1</sup> Drug Addiction Counteraction Act of July 29, 2005, *Journal of Laws* 2005, no. 179, item 1485.

<sup>2</sup> Decree of the Ministry of Health of June 11, 2003 on the list of agents acting similarly to alcohol and conditions and analytical procedures of examination for their presence in the body, *Journal of Laws* 2004, no. 52, item 524.

### 3.4.2. Quantitative analysis

The obtained extracts were analysed using a 2695 Alliance liquid chromatograph manufactured by Waters, which was coupled to a Quattro Micro API mass spectrometer manufactured by Micromass. Separation was performed on a LiChroCART 125 3 mm column filled with Purospher 60 RP-18e. The mobile phase was composed of a mixture of acetonitrile and water spiked with formic acid (1 ml/l). The flow rate of the phase was 0.8 ml/min and separation was conducted in a programmed composition gradient.

The following pseudomolecular ions ( $m/z$ ) were monitored for quantitative analysis: prazepam (IS) – 325, clonazepam – 316, 7-aminoclonazepam – 286. The method of clonazepam determination was optimized and validated. The obtained limits of detection ( $LOD$ ) and determination ( $LOQ$ ) were 4 and 8 ng/ml, respectively. Linearity ranged from 8 to 1000 ng/ml.

## 4. Results and discussion

In the years 2003–2006, the presence of benzodiazepine derivatives was confirmed in 167 cases analysed at the Institute of Forensic Research. The following substances were detected: diazepam, clonazepam, oxazepam, nordiazepam, nitrazepam, estazolam, alprazolam, midazolam and medazepam. A comparison of the number of cases relating to clonazepam, benzodiazepines and also the total number of analysed cases is presented in Figure 3.

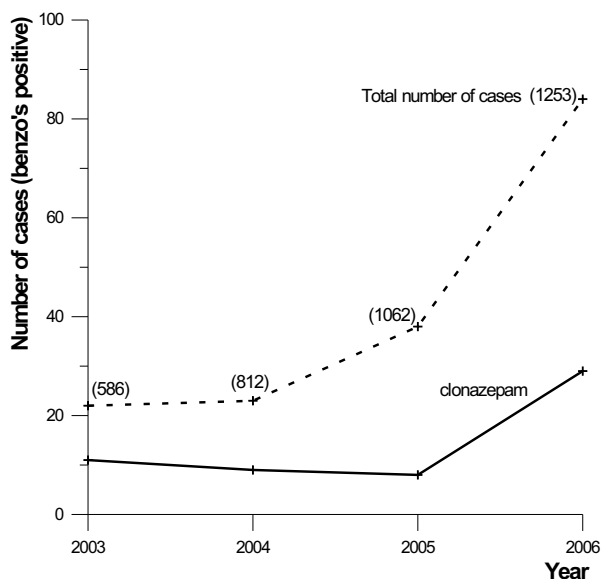


Fig. 3. Comparison of number of cases positive for clonazepam and benzodiazepines and total number of cases analysed in the years 2003–2006.

Clonazepam was one of the benzodiazepines determined most frequently in biological material. In the studied period, its presence was noted in 57 cases.

In 53 blood samples, the concentration of clonazepam was in the therapeutic range (8–80 ng/ml). In 4 cases, the determined concentration of clonazepam was in the toxic range (over 100 ng/ml). The determined ranges of clonazepam concentrations and corresponding number of cases are shown in Figure 4.

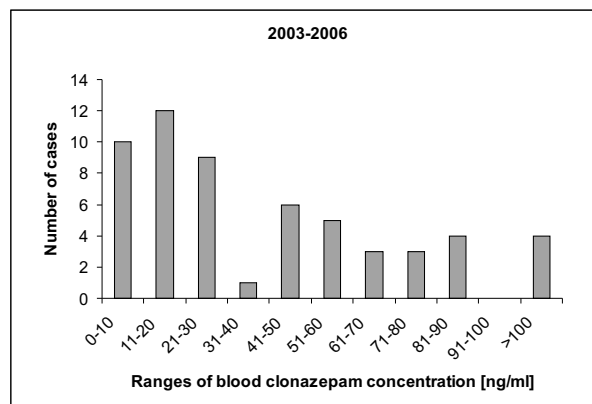


Fig. 4. Bar graph of numbers and concentration ranges of clonazepam positive cases in the years 2003–2006.

It may be stated on the basis of the analyzed cases that clonazepam was used mainly for medical purposes (in the treatment of epileptic states of different aetiology and also as a sedative), and it was administered to this end in 27 cases. Clonazepam was also used by persons addicted to substances of abuse (e.g. morphine, amphetamine and its derivatives, THC) in order to modify the effect of these substances on the body. In 24 of the analyzed blood samples, other xenobiotics were detected besides clonazepam. Data concerning these cases are shown in Table I.

The above mentioned compounds (and ethyl alcohol) affect the CNS, and when administered simultaneously with clonazepam, they interact, i.e. the toxic action of these substances on the body is intensified. This phenomenon is used for criminal purposes. Of the cases analyzed in the Institute of Forensic Research, three concerned the serving of an alcoholic beverage “enriched” by clonazepam in order to commit a robbery. Another three cases concerned administration of clonazepam by juveniles aimed at evoking stimulation and euphoria. This drug is also popular among teenagers and it is mixed with alcoholic beverages during parties in order to obtain a faster “effect”.

Clonazepam is a compound considered as an agent acting similarly to alcohol, thus it should not be used without ongoing consultation with a doctor by persons

TABLE I. COMPOUNDS ACCOMPANYING CLONAZEPAM AND THEIR CONCENTRATIONS IN THE ELABORATED CASES

Determined compounds	Number of cases	Determined concentrations [ng/ml or % <sup>*</sup> ]	Clonazepam concentration [ng/ml]
Alcohol	2	0.4, 0.6	10, 50
Morphine, codeine	7	20–370 20	10–80 30
Amphetamine, MDMA	9 1	72–400 328	8–180
Diazepam, oxazepam, nitrazepam	3	30, 127, 50	87, 66, 20
Amphetamine, nordiazepam	1	32, 540	10
Amphetamine + THC	1	70, 15	75

\* Only for alcohol.

driving vehicles. Of all blood samples positive for clonazepam, 23 were taken from drivers stopped by police as part of a routine control or in connection with a road accident.

## 5. Conclusions

It may be concluded on the basis of the performed study that clonazepam was one of the benzodiazepines detected most frequently in the last 4 years. From 2003 to 2006, it was noted in 57 biological samples analyzed at the Institute of Forensic Research. The number of cases associated with clonazepam administration was particularly high in 2006, when 29 cases were noted. This drug is administered increasingly often in order to evoke and to prolong stimulation and euphoria. Clonazepam administered simultaneously with alcohol may be used for criminal purposes, e.g. to facilitate a robbery.

## References

1. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, The Pharmaceutical Press, London 2004.
2. Podlewski J., Chwalibogowska-Podlowska A., Leki współczesnej terapii, Split Trading, Warszawa 2001.
3. Schulz M., Schmoltdt A., Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics, *Pharmazie* 2003, 58, 447–462.
4. Toksykologia współczesna, Seńczuk W. [red.], PZWL, Warszawa 2005.

5. Winek I., Wagdy W. [et al.], Drug and chemical blood – level data 2001, *Forensic Science International* 2001, 122, 107–123.

### Corresponding author

Ewa Janowska  
Instytut Ekspertyz Sądowych  
ul. Westerplatte 9  
31-033 Kraków  
e-mail: ejanowska@ies.krakow.pl

## KLONAZEPAM – ŚRODEK STOSOWANY W RÓŻNYCH CELACH

### 1. Wstęp

Klonazepam (5-(2-chlorofenyl)-1,3-dihydro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on) jest pochodną leków z grupy benzodiazepiny (rycina 1). Związek ten ma podstawowe cechy charakterystyczne dla większości leków z tej grupy. Wyróżnia go jednak silniejsze działanie przeciwdrgawkowe. Poza hamowaniem aktywności ogniska padaczkowego zapobiega on uogólnianiu się napadów. W typowy dla benzodiazepin sposób zmniejsza napięcie mięśniowe. Działa na struktury ośrodkowego układu nerwowego (OUN), głównie na układ limbiczny i podwzgórze (ułatwia przekazywanie GABA-ergiczne). Lek dobrze się wchłania z przewodu pokarmowego. Całkowity czas jego działania wynosi około 24 godziny. Szybko obserwuje się działanie ośrodkowe, ale jest ono dosyć krótkotrwałe w związku z przechodzeniem leku do tkanek obwodowych. Klonazepam stosowany jest przede wszystkim w napadach mioklonicznych i w stanie padaczkowym [2, 4]. Jest on składnikiem leków przeciwpadaczkowych, takich jak Antelespin, Clonazepamum, Rivotril i Clonopin.

Klonazepam ulega w organizmie przemianom metabolicznym do 7-aminoklonazepamu, a następnie do 7-acetamidoklonazepamu (rycina 2).

Lek ten może wywoływać działania niepożądane, powodując senność, uczucie zmęczenia, zawroty głowy, ataksje. Obserwowano także po przyjęciu klonazepamu pobudzenie, drażliwość, zachowanie agresywne, upośledzenie koncentracji, spowolnienie reakcji, niepamięć następująca [2, 4]. Klonazepam może być stosowany doustnie dla dorosłej osoby w dawce 4–10 mg dziennie (w 3–4 podzielonych dawkach). W stanie padaczkowym może być podany domięśniowo lub dożylnie w dawce 1 mg [2]. Stężenie terapeutyczne klonazepamu we krwi mieści się w zakresie od 4 do 80 ng/ml, natomiast stężenie toksyczne powyżej 100 ng/ml [3, 5].

Klonazepam, zgodnie z Ustawą z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii, zaliczany jest do substancji psychotropowych grupy IV-P<sup>1</sup>. W myśl rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 czerwca 2003 r. leki z grupy pochodnych benzodiazepiny są środkami działającymi podobnie do alkoholu i nie powinny być stosowane przez osoby prowadzące pojazdy mechaniczne<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 29.07.2005, Dz. U. 2005, nr 179, poz. 1485.

<sup>2</sup> Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11.03.2004 r. w sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzenia badań na ich obecność w organizmie, Dz. U. 2004, nr 52, poz. 524.

### 2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było podsumowanie czteroletniego okresu (2003–2006) rutynowych badań dotyczących analizy prób krwi w zakresie obecności środków odurzających, substancji psychotropowych i leków.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Materiał

Wszystkie próby krwi dostarczane do Pracowni Analiz Toksykologicznych Zakładu Toksykologii Sądowej Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie, a pochodzące od kierowców i osób uzależnionych, poddawane są analizie przesiewowej na obecność środków odurzających z grupy pochodnych alkaloidów opium oraz kokainy i substancji psychotropowych, takich jak: amfetaminy (w tym MDMA), kannabinoles, a także leków z grupy pochodnych benzodiazepiny.

#### 3.2. Odczynniki

Stosowano zestaw testowy do oznaczania benzodiazepin „Benzodiazepines Group (Oxazepam/Clonazepam)” metodą ELISA firmy Neogen (Stany Zjednoczone).

Klonazepam, 7-aminoklonazepam i prazepam (standard wewnętrzny – IS) pochodziły z firmy Cerillant (Polska), acetonitryl, woda destylowana (czystości do HPLC) z firmy Merck (Niemcy). Eter diizopropylowy zakupiono w firmie Fluka (Francja).

#### 3.3. Metoda przesiewowa immunoenzymosorpcyjna (ELISA)

W metodzie tej do „dołka” (opłaszczony przeciwciałem) mikroplastyki dodawano 10 µl próby krwi lub kontroli dodatniej (krew z dodatkiem 10 ng/ml klonazepamu) rozcieńczonej w stosunku 1:4 komercyjnym buforem, a następnie konjugat analitu z enzymem. Po inkubacji w temperaturze pokojowej przez 45 minut płyn usuwano z „dołków” i przemywano trzy razy buforem. W dalszej kolejności do osuszonego „dołka” dodawano substrat i inkubowano przez 30 minut. Po inkubacji dodawano roztwór zatrzymujący reakcję. Pomiar absorbancji uzyskanego roztworu przeprowadzano w czasie do 2 godzin od momentu zatrzymania reakcji.

Wszystkie pozytywne wyniki uzyskane metodą przesiewową były potwierdzane metodą specyficzną.

### 3.4. Metoda potwierdzająca – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS)

#### 3.4.1. Ekstrakcja ciecz-ciecz

Do 0,2 ml krwi dodawano prazepam w stężeniu 1000 ng/ml (IS), a następnie 0,2 ml bufor fosforanowy o pH 7,4 i poddawano ekstrakcji 1 ml eteru diizopropylowego.

#### 3.4.2. Analiza ilościowa

Uzyskane ekstrakty badano przy zastosowaniu chromatografu cieczowego firmy Waters 2695 Alliance połączonego ze spektrometrem mas Quattro Micro API firmy Micromass. Rozdział prowadzono na kolumnie LihroCART 125 3 mm z wypełnieniem Purospher 60 RP-18e. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego (1 ml/l). Przepływ fazy wynosił 0,8 ml/min i odbywał się przy programowanym gradiencie składu.

Do analizy ilościowej monitorowano pozorne jony molekularne (m/z) dla: prazepamu (IS) – 325, klonazepamu – 316, dla 7-aminoklonazepamu – 286. Metoda oznaczania klonazepamu została zoptymalizowana i zwalidowana. Uzyskane granice wykrywalności (*LOD*) i oznaczalności (*LOQ*) wynosiły odpowiednio 4 i 8 ng/ml. Zakres liniowości wynosił od 8 do 1000 ng/ml.

## 4. Wyniki badań i ich omówienie

W latach 2003 do 2006 w praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych zanotowano 167 spraw, w których wykazano obecność leków z grupy pochodnych benzodiazepiny. Były to takie środki, jak: diazepam, klonazepam, oksazepam, nordiazepam, nitrazepam, estazolam, alprazolam, midazolam i medazepam. Porównanie liczby spraw, w których wykryto klonazepam, benzodiazepiny oraz całkowitą liczbę spraw analizowanych, przedstawiono na rycinie 3.

Jedną z częściej wykazywanych w materiale biologicznym benzodiazepiną był klonazepam. W ocenianym okresie zarejestrowano 57 przypadków, w których wykazano obecność tego leku.

W 53 próbach krwi wykazano stężenie klonazepamu w zakresie stężeń terapeutycznych (8–80 ng/ml). W 4 przypadkach wyznaczone stężenie klonazepamu było wyższe od stężenia toksycznego (powyżej 100 ng/ml). Wartości wyznaczonych stężeń klonazepamu i odpowiadającą im liczbę przypadków zamieszczono na rycinie 4.

Na podstawie analizy opracowanych przypadków można stwierdzić, że klonazepam był stosowany w celach medycznych (w leczeniu stanów padaczkowych

o różnej etiologii a także jako środek uspokajający) i zarejestrowano 27 takich spraw. Klonazepam był również stosowany przez osoby uzależnione od środków odurzających (np. morfiny) i substancji psychoaktywnych (amfetaminy i jej pochodne, THC) dla modyfikacji działania tych środków na organizm ludzki. W 24 badanych próbach krwi oprócz klonazepamu stwierdzono także inne ksenobiotyki. Dane dotyczące tych przypadków zamieszczono w tabeli I.

Wyżej wymienione związki (a także alkohol etylowy), które wykazują działanie na OUN, przyjmowane równocześnie z klonazepamem, wywołują interakcję, czyli zwiększają działanie toksyczne tych środków na organizm ludzki. Efekt uzyskany przez zastosowanie wspomnianych związków jest wykorzystywany w celach przestępczych. W Instytucie Ekspertyz Sądowych odnotowano 3 przypadki, które dotyczyły podania osobom napoju alkoholowego „wzmocnionego” klonazepamem w celu dokonania kradzieży na ich szkodę. Zanotowano także 3 sprawy dotyczące przyjmowania przez osoby nieletnie klonazepamu w celach wywołania stanu pobudzenia i euforii. Lek ten jest popularny wśród nastolatków i na spotkaniach młodzieżowych dla uzyskania szybszego „efektu” stosowany bywa razem z napojami alkoholowymi.

Klonazepam jest związkiem należącym do środków działających podobnie do alkoholu i nie powinien być stosowany bez stałej konsultacji z lekarzem przez osoby prowadzące pojazdy mechaniczne. Spośród wszystkich prób krwi, w których wykryto klonazepam, 23 pochodziło od kierowców zatrzymanych do kontroli lub w związku ze zdarzeniem drogowym.

## 5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że w okresie ostatnich 4 lat klonazepam był jedną z częściej wykrywaną we krwi benzodiazepiną. W okresie od 2003 do 2006 roku zanotowano w praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych 57 przypadków, w których wykazano w materiale biologicznym obecność tego leku. Szczególnie dużo przypadków związanych z użyciem klonazepamu stwierdzono w 2006 roku. Ich liczba wynosiła 29. Lek ten jest coraz chętniej przyjmowanym środkiem w celu wywołania i przedłużenia stanu pobudzenia i euforii. Klonazepam podawany równoległe z alkoholem etylowym może być stosowany z zamiarem dokonania przestępstwa, np. w celu ułatwienia kradzieży.