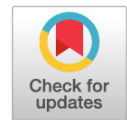


DOI: <https://doi.org/10.17816/fm705>

Обнаружение клобазама и его метаболита в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием при отравлении

А.А. Волкова^{1,2}, Р.А. Калёкин^{1,2}, А.М. Орлова¹¹ Российский центр судебно-медицинской экспертизы, Москва, Российская Федерация² Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Проблема определения факта острого и летального отравления клобазамом до настоящего времени остаётся актуальной задачей аналитической токсикологии. Лекарственное вещество клобазам относится к группе бензодиазепинов, включённых в список психоактивных веществ, оборот которых ограничен, так как имеет высокий профиль токсичности при передозировке и злоупотреблении.

Цель исследования — предложить простую, достоверную и чувствительную методику идентификации клобазама и его метаболита в моче современным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-QqQ-МС/МС).

Материал и методы. Нами описан простой и чувствительный метод ВЭЖХ-QqQ-МС/МС для качественного определения клобазама в моче.

Результаты. По результатам исследования, время удерживания в подобранных условиях хроматографирования для клобазама составило 5,17 мин, а его метаболита (норклобазама), найденного в моче, — 4,56 мин. Наиболее интенсивный (основной) пик для клобазама — 259 m/z, для норклобазама — 245 m/z.

Заключение. Впервые представлена валидированная методика химико-токсикологического исследования при отравлении клобазамом методом ВЭЖХ-МС/МС, апробированная как на модельной смеси, так и на реальной биологической матрице мочи пациента после приёма клобазама. Данная методика, применяемая в качестве подтверждающего метода исследования, является дополнением к клинической картине в судебно-медицинской экспертизе.

Ключевые слова: клобазам; высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием; масс-анализатор QqQ; ВЭЖХ-QqQ-МС/МС; детекция; подготовка образца мочи.

Как цитировать

Волкова А.А., Калёкин Р.А., Орлова А.М. Обнаружение клобазама и его метаболита в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием при отравлении // *Судебная медицина*. 2022. Т. 8, № 4. С. 47–55. DOI: <https://doi.org/10.17816/fm705>

DOI: <https://doi.org/10.17816/fm705>

Detection of clobazam and its metabolites in urine during poisoning using HPLC-QqQ-MS/MS

Alla A. Volkova^{1, 2}, Roman A. Kalekin^{1, 2}, Alevtina M. Orlova¹

¹ Russian Centre of Forensic Medical Expertise, Moscow, Russian Federation

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Determining the incidence of acute and lethal poisoning with clobazam remains an urgent task of analytical toxicology. The medicinal substance clobazam belongs to the group of benzodiazepines, which is included in the list of psychoactive substances whose turnover is limited because of its high toxicity profile in overdose and abuse.

AIM: To propose a simple, reliable, and sensitive technique for the identification of clobazam and its metabolite in the urine by the modern high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-QqQ-MS/MS).

MATERIALS AND METHODS: We have described a simple and sensitive HPLC-QqQ-MS/MS method for the qualitative determination of clobazam in the urine.

RESULTS: The retention time in the selected chromatography conditions for clobazam was 5.17 min, and its metabolite (norclobazam) in urine was 4.56 min. The base peaks for clobazam and norclobazam were 259 m/z and 245 m/z, respectively.

CONCLUSION: For the first time, this study provides a validated method of chemical-toxicological examination for poisoning with clobazam by HPLC-MS/MS, tested both on a model mixture and real biological matrix of the patient's urine after taking clobazam. This technique can be a confirmatory research method in addition to the clinical picture in forensic medical examination.

Keywords: clobazam; high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection; QqQ mass analyzer; HPLC-QqQ-MS/MS; detection; urine sample preparation.

To cite this article

Volkova AA, Kalekin RA, Orlova AM. Detection of clobazam and its metabolites in urine during poisoning using HPLC-QqQ-MS/MS. *Russian Journal of Forensic Medicine*. 2022;8(4):47–55. DOI: <https://doi.org/10.17816/fm705>

Received: 12.03.2022

Accepted: 13.10.2022

Published: 30.11.2022

DOI: <https://doi.org/10.17816/fm705>

高效液相色谱-串联质谱法检测中毒患者尿液中的氯巴扎姆及其代谢物

Alla A. Volkova^{1,2}, Roman A. Kalekin^{1,2}, Alevtina M. Orlova¹¹ Russian Centre of Forensic Medical Expertise, Moscow, Russian Federation² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

简评

论证。确定氯巴扎姆的急性和致死性中毒事实的问题仍然是分析毒理学的一项紧迫任务。药物氯巴占属于苯二氮卓类药物，由于其在过量和滥用的情况下具有高毒性，因此被列入限制流通的精神活性物质清单中。

该研究的目的是提出一种简单、可靠和敏感的技术，通过现代高效液相色谱-串联质谱检测（HPLC-QqQ-MS/MS）鉴定尿液中的氯巴扎姆及其代谢物。

材料与方法。我们描述了一种简单而敏感的HPLC-QqQ-MS/MS方法，用于定性检测尿液中的氯巴扎姆。

结果。根据研究结果，在选定的色谱条件下，氯巴扎姆的保留时间为5.17分钟，而在尿液中发现的其代谢物（去甲氯巴扎姆）则为4.56分钟。氯巴扎姆最强烈的（主）峰是259 m/z，诺拉扎姆是245 m/z。

结论。首次提出了一种经过验证的HPLC-MS/MS方法，用于调查氯巴扎姆中毒的化学毒物学。在一个模型混合物和一个病人服用氯巴扎姆后的尿液的真实生物基质上都得到了验证。这种技术作为一种确认性检查技术，是对法医临床情况的一种补充。

关键词：氯巴占；高效液相色谱串联质谱检测；QqQ质量分析仪；HPLC-QqQ-MS/MS；检测；尿样制备。

To cite this article

Volkova AA, Kalekin RA, Orlova AM. 高效液相色谱-串联质谱法检测中毒患者尿液中的氯巴扎姆及其代谢物. *Russian Journal of Forensic Medicine*. 2022;8(4):47-55. DOI: <https://doi.org/10.17816/fm705>

收到: 12.03.2022

接受: 13.10.2022

发布日期: 30.11.2022

ОБОСНОВАНИЕ

По данным ежегодного токсикологического мониторинга, острые отравления наркотическими средствами остаются актуальной проблемой, а определение факта острого и летального отравления клобазамом до настоящего времени является первостепенной задачей аналитической токсикологии [1]. Судебно-медицинская диагностика отравлений наркотическими средствами и психотропными веществами со смертельным исходом основана на совокупности морфологических данных и результатов определения веществ в биологических жидкостях и тканях трупа. Но только результаты судебно-химического и химико-токсикологического исследования помогают установить вид наркотических средств и психотропных веществ, их концентрацию, что позволяет высказать суждение о времени приёма и принятой дозе этих веществ [2–4].

Лекарственное вещество клобазам относится к группе бензодиазепинов. Клобазам включён в список психоактивных веществ, оборот которых, а также незаконное приобретение, хранение, перевозка, изготовление, переработка без цели сбыта в Российской Федерации ограничены.

Химическое название клобазам: 7-хлор-1-метил-5-фенил-1Н-1,5-бензодиазепин-2,4(3Н,5Н)-дион. Молекулярная формула: $C_{16}H_{13}ClN_2O_2$. Торговое название: Фризиум. Лекарственная форма: таблетки по 10 и 20 мг.

Клобазам — противосудорожное, анксиолитическое средство, действует как транквилизатор, считается сильнодействующим препаратом. Клобазам купирует эпилептические приступы, уменьшает напряжённость, раздражение, возбуждение, агрессивность. Клобазам относится ко второму поколению противосудорожных препаратов [5–7]. Несмотря на то, что клобазам является лекарственным препаратом с меньшими побочными эффектами в сравнении с другими производными бензодиазепинов, он оказывает фармакокинетическое взаимодействие на такие препараты, как карбамазепин, фенитоин, фенобарбитал, примидон, вальпроат, ламотриджин, левитирацетам, окскарбазепин, топирамат, вигабатрин, что обуславливает его влияние на сопутствующую терапию и увеличение или наличие побочных эффектов [8–11].

Клобазам быстро метаболизируется в печени и потом выводится путём почечной элиминации. Через почки выводится менее 1% клобазам и менее 10% метаболита N-дезметилклобазам (норклобазам). Норклобазам значительно более устойчив в организме, чем клобазам, его период полураспада примерно вдвое меньше, чем у клобазам (78–82 и 36–41 ч соответственно), а в терапевтических дозах концентрация в сыворотке крови в 3–5 раз

выше [12–16]. При терапевтическом приёме клобазам обнаруживается в биологических жидкостях в диапазоне концентраций 0,1–1 мг/л, токсический эффект начинает проявляться при десятикратном увеличении дозы, а острое отравление может наступить при пероральном приёме 300 мг.

В настоящее время лабораторные методы, которые позволяют обнаружить клобазам и его метаболиты при исследовании биологического объекта (моча) с использованием неинвазивного метода отбора пробы, на современном уровне не описаны. Существует несколько опубликованных методик [16] определения клобазам и норклобазам методом жидкостной и газовой хроматографии с использованием тандемной масс-спектрометрии, которые апробированы на крови или плазме крови. Имеется руководство¹ по пробоподготовке жидкость-жидкостной экстракции при исследовании биологического объекта (мочи).

Актуальность использования при химико-токсикологическом исследовании биологических объектов, отобранных у пациентов (потерпевших), имеет большую важность ввиду того, что применение в медицине клобазам достаточно часто встречается в детском возрасте, тем более что с мочой выводится более 90% препарата.

Цель исследования — предложить простую, достоверную и чувствительную методику для идентификации клобазам и его метаболита в моче современным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-QqQ-МС/МС) после твердофазной экстракции, не требующую инвазивного вмешательства.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Пробоподготовка

Для анализа использовали жидкостный хроматограф Nexera X2 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором Shimadzu LCMS-8050.

Реактивы: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде с 2 мМ формиата аммония, ацетонитрил, этанол, метанол (чистый для анализа; ч.д.а.), 0,1 М раствора монофосфата калия (KH_2PO_4 ; химически чистый; х.ч.), 5% уксусной кислоты (ч.д.а.), 2% раствор гидроксида аммония (NH_4OH ; ч.д.а.).

В данном исследовании пробоподготовка была выполнена при помощи патронов Agilent Bond Elut Certify (Agilent, США), 130 мг, 3 мл. После кондиционирования патрона 2 мл метанола (ч.д.а.) и уравнивания 2 мл 0,1 М KH_2PO_4 (х.ч.) пробу мочи человека, употреблявшего клобазам, объёмом 1 мл вводили в патрон. Весь элюат собирали во флакон. Элюент для стадий промывки был

¹ Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services [accessed December 4, 2020]. Режим доступа: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>.

Таблица 1. Программа градиентного элюирования**Table 1.** Gradient elution program

Время, мин	А, %	В, %
0.00	99,0	1,0
1.00	99,0	1,0
8.00	1,0	99,0
9.00	1,0	99,0
9.10	99,0	1,0
11.00	99,0	1,0

разделён на три аликвоты по 1 мл каждая. Первую промывку выполняли 1 мл 5% уксусной кислоты (ч.д.а.), а остальные две — по 1 мл метанола. Каждую фракцию элюата собирали отдельно во флакон. Элюирование выполняли трижды с помощью 1 мл смеси ацетонитрила (ч.д.а.) с 2% NH_4OH (ч.д.а.). Каждую фракцию собирали отдельно и объединяли для дальнейшего исследования.

Условия хроматографирования

Параметры хроматографической системы LC-System Nexera X2 Shimadzu. Хроматографическая колонка Kinetex (Phenomenex) 2.6u XB-C18 100A 100×2,1 мм. Температура колонки 40°C. Использовалась комбинированная подвижная фаза с двумя компонентами: А — 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде с 2 мМ формиата аммония; В — ацетонитрил, объём вводимой пробы 5 мМ³.

Условия градиентного режима подачи элюента приведены в табл. 1.

Условия масс-спектрометрического детектирования

Параметры масс-спектрометрического детектирования приведены в табл. 2. Условия регистрации аналитических сигналов были проведены в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM): энергия соударений 20 эВ; напряжение на фрагментаторе 100 В; скорость сканирования 5 спектров/сек. Оптимизацию условий детектирования проводили с использованием

рабочего раствора концентрацией 0,1 мкг/см³. Энергию соударений (collision energy, CE) оптимизировали с шагом 10 В по максимальному отклику характеристичного продукт-иона.

Этическая экспертиза

Этический комитет Медицинского центра «Азбука Здоровья» дал положительное заключение (протокол № 1 от 17.01.2022). Забор проб биологической жидкости производили неинвазивным способом, добровольно, с письменного согласия пациентов, на анонимных условиях и обезличенных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительно изучали раствор стандартного образца клобазама. Для этого получали 0,1% спиртовой раствор клобазама, который количественно стандартизовали методом ультрафиолетовой (УФ) спектрофотометрии. Затем из мерной колбы отбирали 1 мл 0,1% раствора и добавляли 9 мл этанола для получения 0,01% (0,1 мг/мл) раствора клобазама (испытуемый раствор), который количественно стандартизовали методом УФ-спектрофотометрии.

Далее исследовали полученные извлечения из мочи методом ВЭЖХ-QqQ-МС/МС.

Результаты хроматографирования и обнаружения клобазама и норклобазама представлены на рис. 1 и 2.

В вышеописанных условиях хроматографирования время удерживания рабочего стандартного образца составило 5,17 мин, а его метаболита, найденного в моче, — 4,56 мин (см. рис. 1).

Согласно данным рис. 2, МС/МС-параметры анализа следующие: ион-прекурсор клобазама (m/z^*) — 259; фрагментатор (V^{**}) — 224; ион-прекурсор норклобазама (m/z) — 245; фрагментатор (V) — 210. (* После ионизации вещества ионы разделяются в масс-анализаторе в соответствии с их отношением массы к заряду; ** Селективное деление вещества электрическим разрядом, измеряемое в вольтах).

Таблица 2. Параметры масс-спектрометрического детектирования (трёхкврупольный масс-селективный детектор, МС QqQ)**Table 2.** Parameters of mass spectrometric detection (three quadrupole mass selective detector, MS QqQ)

Параметры интерфейса	Характеристики, ед. изм.
Поток газа-нагревателя (Heating gas flow), л/мин	10
Температура интерфейса (Interface Temperature), °C	300
Температура линии десольвации (DL Temperature), °C	250
Распыление (Nebulizer), л/мин	3
Поток газа-осушителя (Drying Gas Flow), л/мин	10
Температура блока нагревателя (Heat Block Temperature), °C	400
Температура растворения (Dezolvation Temperature), °C	520
Напряжение на интерфейсе (Interface Voltage), V	4000
Режим детектирования 1	MS2 (Full SCAN) 70–1000 а.е.м.
Режим детектирования 2	MRM

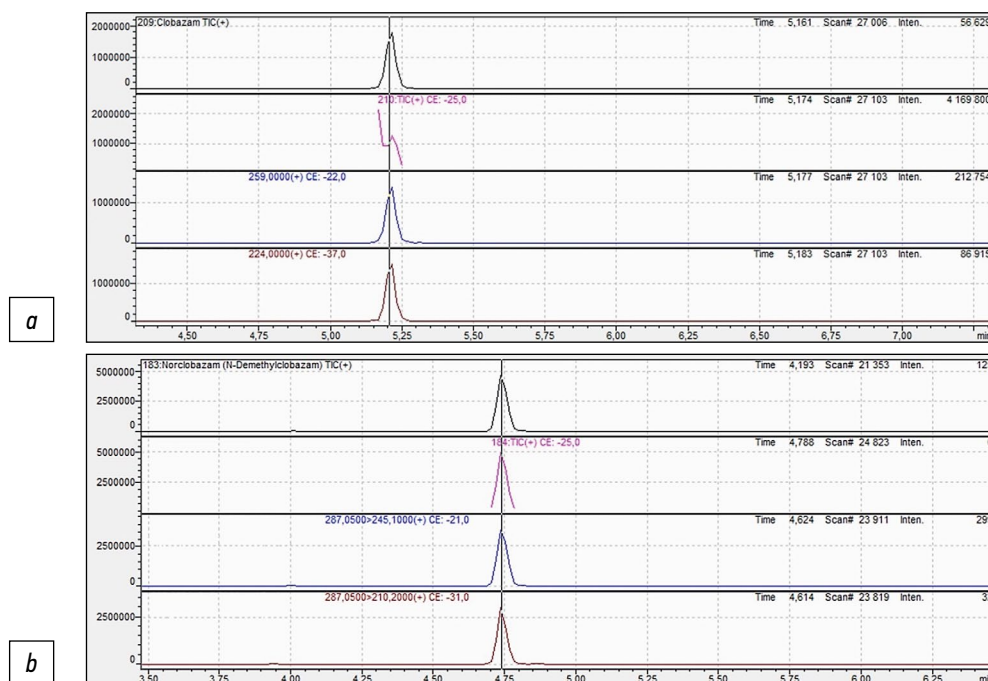


Рис. 1. Хроматограммы клобазам (а) и норклобазам (б) при исследовании методом ВЭЖХ-QqQ-МС/МС.
Fig. 1. Chromatograms of clobazam (a) and norclobazam (b) in the study by HPLC-QqQ-MS/MS.

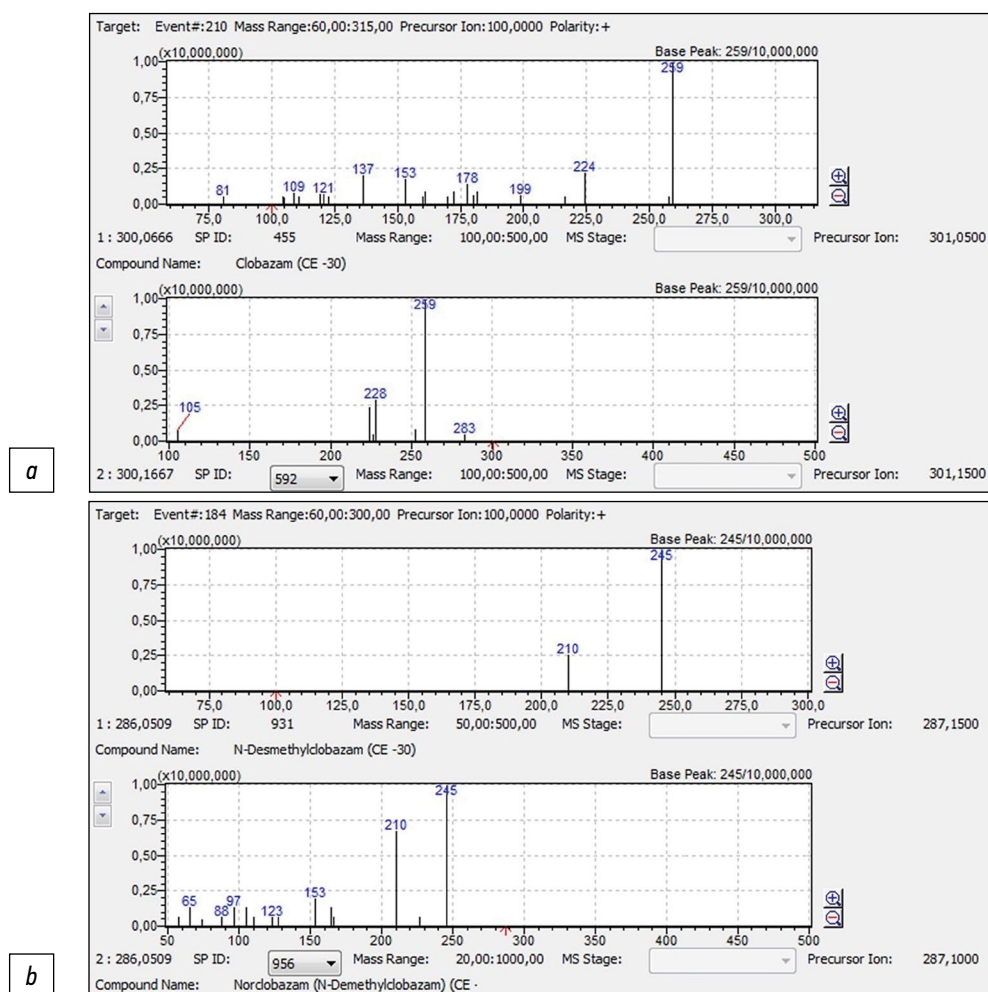


Рис. 2. Масс-спектры клобазам (а) и норклобазам (б) при исследовании методом ВЭЖХ-QqQ-МС/МС.
Fig. 2. Mass spectra of clobazam (a) and norclobazam (b) in the study by HPLC-QqQ-MS/MS.

Таблица 3. Параметры режима мониторинга множественных реакций (MRM) клобазама и норклобазама**Table 3.** Parameters of the multiple reaction monitoring mode (MRM) of clobazam and norclobazam

Аналит	Масса на Q1 → (переход) масса на Q3	Энергия соударений, эВ	Напряжение на фрагменторе, В	Время сканирования одного MRM-перехода
Клобазам	301→210	25	100	5 спектров/сек
	224	37		
Норклобазам	287→184	25	100	5 спектров/сек
	210	31		

Таблица 4. Статистическая обработка результатов хроматографирования клобазама и норклобазама**Table 4.** Statistical processing of chromatography results of clobazam and norclobazam

Параметр	Обнаруженное соединение	
	Клобазам	Норклобазам
Время удерживание, n=6	5,174	4,555
Дисперсия, σ^2	0,00009	0,06452
Среднеквадратическое отклонение, σ	0,00929	0,25402
Коэффициент вариации, V	0,18%	5,58%
Отношение показателя асимметрии к его ошибке, A/ma	-0,54265	-0,72547
Отношение показателя эксцесса к его ошибке, E/me	-3,19999	-3,07923
Среднее линейное отклонение, \bar{a}	0,00638	0,18087

Полученные результаты хроматографирования были статистически обработаны (табл. 3, 4). Как видно из табл. 4, относительное стандартное отклонение норклобазама при хроматографировании извлечения из мочи составляет 5,5%, что оптимально для извлечения из биологической матрицы с учетом её влияния.

ОБСУЖДЕНИЕ

Получены результаты оптимального хроматографического разделения клобазама/норклобазама от соэкстрактивных веществ биологической матрицы мочи. Поскольку пациенты обычно скрывают приём клобазама, а также в случае намеренного отравления клобазамом сторонним лицом, для окончательного диагноза отравления клобазамом требуется инструментальный токсикологический анализ. Следует отметить, что в России анализ мочи является обязательным при проведении токсикологического анализа. По этой причине в настоящем исследовании сообщается о проверенном методе определения клобазама в моче. Разработанный метод чувствителен, включает в себя простую и быструю пробоподготовку, для которой требуется всего 0,5 мл биологического образца.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ

Клобазам и норклобазам были измерены в образцах биологического объекта (моча) качественно в соответствии с руководством Управления по санитарному

надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) по валидации биоаналитического метода². Хроматограммы образцов мочи не выявили интерферирующих соединений в матрице во время удерживания анализируемых веществ. Нижний предел количественной оценки (lower limit of quantification, LLOQ) был установлен на уровне 0,1 нг/мл для клобазама/норклобазама в обеих матрицах. Отношение сигнал/шум при LLOQ составило >10. Предел обнаружения (limit of detection, LOD) был определен как 0,05 нг/мл для клобазама/норклобазама. Точность и прецизионность внутрисуточных и межсуточных измерений соответствовали критериям FDA, принятым для анализа аналитов в моче.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан и валидирован простой и чувствительный метод ВЭЖХ-QqQ-МС/МС для идентификации клобазама и норклобазама в образцах мочи пациентов с отравлением клобазамом. Впервые представлена валидированная методика химико-токсикологического исследования при отравлении клобазамом методом ВЭЖХ-МС/МС, апробированная как на модельной смеси, так и на реальной биологической матрице мочи пациента после приёма клобазама.

Данная методика может применяться в качестве подтверждающего метода исследования и дополнять клиническую картину в судебно-медицинской экспертизе.

² Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services [accessed December 4, 2020]. Режим доступа: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: А.А. Волкова, Р.А. Калёкин, А.М. Орлова — сбор данных, написание текста рукописи, научное редактирование текста рукописи, рассмотрение и одобрение окончательного варианта рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова А.А., Орлова А.М., Калёкин Р.А., Невмятова С.Р. Анализ возможности проведения судебно-химического исследования при отравлении клобазамом // Судебно-медицинская экспертиза. 2022. Т. 65, № 1. С. 35–40. doi: 10.17116/sudmed20226501135
2. Маркин П.А., Москалева Н.Е., Апполонова С.А., и др. Разработка метода тонкослойной хроматографии для одновременного определения клобазамы и залеплона в смеси // Актуальные вопросы судебной медицины и права: сборник научно-практических статей. Казань, 2021. С. 158–161.
3. Орлова А.М., Калёкин Р.А., Волкова А.А., и др. Обнаружение клобазамы в моче методом тонкослойной хроматографии // Вестник Воронежского государственного университета. 2021. № 3. С. 106–113.
4. Gauthier A.C., Mattson R.H. Clobazam: A safe. Efficacious and newly rediscovered therapeutic for epilepsy // CNS Neurosci Ther. 2015. Vol. 21, N 7. P. 543–548. doi: 10.1111/cns.12399
5. Arya R., Giridharan N., Anand V., Garg S.K. Clobazam monotherapy for focal or generalized seizures // Cochrane Database Syst Rev. 2018. Vol. 2018, N 7. P. CD009258. doi: 10.1002/14651858.CD009258.pub3
6. Tolbert D., Larsen F. A comprehensive overview of the clinical pharmacokinetics of Clobazam // J Clin Pharmacol. 2019. Vol. 59, N 1. P. 7–19. doi: 10.1002/jcph.1313
7. Kheireldin R. A case report of Clobazam toxicity related to cannabidiol and Clobazam drug-drug interaction // Translation University Toledo J Med Sci. 2019. N 6. P. 35–36. doi: 10.46570/utjms.vol6-2019-339
8. Brigo F., Lattanzi S. Anticonvulsant agents: Benzodiazepines (Clobazam. Clonazepam. Diazepam. Lorazepam. Midazolam) // Riederer P., Laux G., Nagatsu T., et al., editors. NeuroPsychopharmacotherapy. Springer Nature Switzerland AG, 2020. P. 1–8. doi: 10.1007/978-3-319-56015-1_440-1

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. A.A. Volkova, R.A. Kalekin, A.M. Orlova — data collection, writing the text of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content, review and approve the final manuscript.

9. Kheireldin R. A case report and literature review of Clobazam toxicity related to CBD and Clobazam drug-drug interaction // J Clin Med Res. 2019. doi: 10.37191/Mapsci-2582-4333-1(2)-012
10. Aung T. Rare but life-threatening aspiration pneumonia related to initiation of Clobazam therapy // Epilepsy Behavior Rep. 2020. N 14. P. 100406. doi: 10.1016/j.ebr.2020.100406
11. Huddart R., Leeder J.S., Altman R.B., Klein T.E. Pharm GKB summary: Clobazam pathway. Pharmacokinetics // Pharmacogenet Genomics. 2018. Vol. 28, N 4. P. 110–115. doi: 10.1097/FPC.0000000000000327
12. Hammer H., Ebert B., Jensen H.S., Jensen A.A. Functional characterization of the 1.5-benzodiazepine Clobazam and its major active metabolite N-desmethylclobazam at human GABAA receptors expressed in xenopus laevis oocytes // PLoS One. 2015. Vol. 10, N 3. P. e0120239. doi: 10.1371/journal.pone.0120239
13. Soury E., Farahani A.D., Ahmadkhanhi R., Amini M. A stability indicating HPLC method for the determination of Clobazam and its basic degradation product characterization // Daru. 2014. Vol. 22, N 1. P. 49. doi: 10.1186/2008-2231-22-49
14. Jensen H.S., Nichol K., Lee D., Ebert B. Clobazam and its active metabolite N-desmethylclobazam display significantly greater affinities for $\alpha 2$ - versus $\alpha 1$ -GABAA-receptor complexes // PLoS One. 2014. Vol. 9, N 2. P. e88456. doi: 10.1371/journal.pone.0088456
15. Bajaja A.O., Ly D., Johnson-Davisab K.L. Retrospective analysis of metabolite patterns of Clobazam and N-desmethylclobazam in human plasma by LC-MS/MS // J Mass Spectrom Adv Clin Lab. 2022. N 24. P. 100–106. doi: 10.1016/j.jmsacl.2022.04.005
16. Laloup M., Fernandez M.R., De Boeck G., et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair // J Anal Toxicol. 2005. Vol. 29, N 7. P. 616–626. doi: 10.1093/jat/29.7.616

REFERENCES

1. Volkova AA, Orlova AM, Kalekin RA, Nevmyatova SR. Analysis of the possibility of conducting a forensic chemical study in case of Clobazam poisoning. *Forensic Medical examination*. 2022;65(1):35–40. (In Russ). doi: 10.17116/sudmed20226501135
2. Markin PA, Moskaleva NE, Appolonova SA, et al. Development of a thin-layer chromatography method for simultaneous determination of Clobazam and zaleplon in a mixture. In: *Topical issues of forensic medicine and law. Collection of scientific and practical articles*. Kazan; 2021. P. 158–161. (In Russ).
3. Orlova AM, Kalekin RA, Volkova AA, et al. Detection of Clobazam in urine by thin-layer chromatography. *Bulletin Voronezh State University*. 2021;(3):106–113. (In Russ).
4. Gauthier AC, Mattson RH. Clobazam: A safe, efficacious and newly rediscovered therapeutic for epilepsy. *CNS Neurosci Ther*. 2015;21(7):543–548. doi: 10.1111/cns.12399
5. Arya R, Giridharan N, Anand V, Garg SK. Clobazam monotherapy for focal or generalized seizures. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2018(7):CD009258. doi: 10.1002/14651858.CD009258.pub3
6. Tolbert D, Larsen FA. A comprehensive overview of the clinical pharmacokinetics of Clobazam. *J Clin Pharmacol*. 2019;59(1):7–19. doi: 10.1002/jcph.1313
7. Kheireldin R. A case report of Clobazam toxicity related to cannabidiol and Clobazam drug-drug interaction. *Translation University Toledo J Med Sci*. 2019;(6):35–36. doi: 10.46570/utjms.vol6-2019-339
8. Brigo F, Lattanzi S. Anticonvulsant agents: Benzodiazepines (Clobazam, Clonazepam, Diazepam, Lorazepam, Midazolam). In book: *Riederer P., Laux G., Nagatsu T., et al., editors. NeuroPsychopharmacotherapy*. Springer Nature Switzerland AG; 2020. P. 1–8. doi: 10.1007/978-3-319-56015-1_440-1
9. Kheireldin R. A case report and literature review of Clobazam toxicity related to cbd and Clobazam drug-drug interaction. *J Clin Med Res*. 2019. doi: 10.37191/Mapsci-2582-4333-1(2)-012
10. Aung T. Rare but life-threatening aspiration pneumonia related to initiation of Clobazam therapy. *Epilepsy Behavior Rep*. 2020;14:100406. doi: 10.1016/j.ebr.2020.100406
11. Huddart R, Leeder JS, Altman RB, Klein TE. Pharm GKB summary: Clobazam pathway. *Pharmacokinetics. Pharmacogenet Genomics*. 2018;28(4):110–115. doi: 10.1097/FPC.0000000000000327
12. Hammer H, Ebert B, Jensen HS, Jensen AA. Functional characterization of the 1.5-benzodiazepine Clobazam and its major active metabolite N-desmethylclobazam at human GABAA receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120239. doi: 10.1371/journal.pone.0120239
13. Soury E, Farahani AD, Ahmadkhaniha R, Amini M. A stability indicating HPLC method for the determination of Clobazam and its basic degradation product characterization. *Daru*. 2014;22(1):49. doi: 10.1186/2008-2231-22-49
14. Jensen HS, Nichol K, Lee D, Ebert B. Clobazam and its active metabolite N-desmethylclobazam display significantly greater affinities for $\alpha 2$ - versus $\alpha 1$ -GABAA-receptor complexes. *PLoS One*. 2014;9(2):e88456. doi: 10.1371/journal.pone.0088456
15. Bajaja AO, Ly D, Johnson-Davisab KL. Retrospective analysis of metabolite patterns of Clobazam and N-desmethylclobazam in human plasma by LC-MS/MS. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab*. 2022;(24):100–106. doi: 10.1016/j.jmsacl.2022.04.005
16. Laloup M, Fernandez MR, De Boeck G, et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair. *J Anal Toxicol*. 2005;29(7):616–626. doi: 10.1093/jat/29.7.616

ОБ АВТОРАХ

* **Калёкин Роман Анатольевич**, д.фарм.н.,
адрес: Россия, 125284, Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4989-3511>;
eLibrary SPIN: 2473-7421; e-mail: himija@rc-sme.ru

Волкова Алла Андреевна, к.фарм.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9882-2330>;
e-mail: himija@rc-sme.ru

Орлова Алевтина Михайловна, к.фарм.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5419-1418>;
eLibrary SPIN: 7685-2315; e-mail: himija@rc-sme.ru

AUTHORS' INFO

* **Roman A. Kalekin**, Dr. Sci. (Pharm.);
address: 12/13, Polikarpov Street, Moscow, 125284 Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4989-3511>;
eLibrary SPIN: 2473-7421; e-mail: himija@rc-sme.ru

Alla A. Volkova, Cand. Sci. (Pharm.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9882-2330>;
e-mail: himija@rc-sme.ru

Alevtina M. Orlova, Cand. Sci. (Pharm.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5419-1418>;
eLibrary SPIN: 7685-2315; e-mail: himija@rc-sme.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author